



Università degli Studi di Milano

Dottorato in Medicina Molecolare



Curriculum: Genomica, Proteomica e Tecnologie Correlate (XIII ciclo)

Tesi di Dottorato: anno 2009/2010

**Studio degli addotti catecolammine-proteine in sostanza nera e nel putamen
umani**

Dottorando: Alessia TEMPESTINI

Matricola: R07759

Tutore: Prof. Massimo LUZZANA

Co-tutore: Dr. Luigi ZECCA

Direttore della scuola di dottorato: Ch.ma Prof.ssa Maria Luisa VILLA

Borsa di dottorato: Università degli studi di Milano, attività di formazione svolta presso il laboratorio di Neurochimica del reparto di "Biologia dell'invecchiamento cerebrale e delle malattie neurodegenerative" –Istituto di Tecnologie Biomediche-C.N.R.

Anno Accademico: 2009/2010

INDICE

1 INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 Il morbo di Parkinson: introduzione	pag. 1
1.2 Aree colpite	pag. 2
1.3 Eziologia del morbo di Parkinson	pag. 5
1.3.1 Geni coinvolti	pag. 5
1.3.1.1 α-Sinucleina	pag. 5
1.3.1.2 Parkina	pag. 7
1.3.1.3 Altri geni	pag. 8
1.4 Patogenesi del morbo di Parkinson	pag. 8
1.4.1 Aggregazione proteica	pag. 9
1.4.2 Disfunzioni mitocondriali e tossine	pag. 9
1.4.3 Stress ossidativo	pag. 11
1.5 La neuromelanina	pag. 12
1.5.1 Struttura della NM	pag. 12
1.5.2 Precursori della NM	pag. 12
1.5.3 Funzioni neuroprotettiva e neurotossica della NM	pag. 14

1.6 La dopamina	pag. 15
1.6.1 Sintesi e catabolismo	pag. 15
1.6.2 Tossicità della metanfetamina dopamina-mediata	pag. 16
1.6.3 Meccanismi di ossidazione della DA	pag. 17
1.6.4 Reattività dei chinoni della DA	pag. 18
1.6.5 Legame del dopamin-chinone alle proteine	pag. 20
1.6.5.1 La α-sinucleina	pag. 20
1.6.5.2 Altre proteine	pag. 21
2. SCOPO DEL LAVORO	pag. 23
3 MATERIALI E METODI	pag. 25
3.1 Reagenti	pag. 25
3.2 Tessuti analizzati	pag. 25
3.3 Estrazione di proteine da tessuto cerebrale	pag. 26
3.4 Analisi dei frammenti proteici con LC-MS	pag. 26
3.5. Resina di fenil-boronato per l'isolamento di cis-dioli	pag. 27
3.5.1 Utilizzo della resina	pag. 27

3.5.2	Applicazione delle proteine sulla resina PBA	pag. 29
3.6	Idrolisi delle proteine	pag. 30
3.7	Sintesi degli standard	pag. 30
3.7.1	Cisteinil-DA	pag. 30
3.7.2	Glutathionil-DA	pag. 31
3.8	Estrazione della Cys DA libera da tessuto	pag. 31
3.9	Analisi in HPLC delle catecolamine libere, degli standard e degli idrolizzati	pag. 31
3.9.1	HPLC-UV	pag. 31
3.9.2	HPLC-EC	pag. 32
3.10	Analisi dati per la Cys-DA libera	pag. 32
4.	RISULTATI	pag. 33
4.1	Estrazioni proteiche e analisi in LC-MS	pag.
4.2	Utilizzo della resina PBA	pag. 35
4.2.1	Verifica della capacità di legame e di sensibilità della resina	pag. 35
4.2.1.1	Cys-DA	pag. 35
4.2.1.2	GSH-DA	pag. 36

4.2.1.3 Analisi della estrazione proteica con standard interno	pag. 38
4.2.2 Analisi degli amminoacidi delle proteine caricate sulla resina	pag. 40
4.2.2.1 Sostanza nera	pag. 40
4.2.2.1.1 SN 2010_022	pag. 40
4.2.2.1.2 SN 2009_026	pag. 43
4.2.2.1.3 SN 2009_019	pag. 44
4.2.2.2 Putamen	pag. 46
4.2.2.2.1 PUT 2010_019	pag. 46
4.2.2.2.2 PUT 2009_007	pag. 47
4.2.2.2.3 PUT 2010_032	pag. 48
4.2.2.2.4 PUT 2010_032 denaturato	pag. 50
4.3 Analisi della cisteinil-DA libera in HPLC-EC	pag. 51
5. DISCUSSIONE	pag. 53
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 56

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

Lista delle principali abbreviazioni riportate nel testo, in ordine di apparizione.

Morbo di Parkinson (Parkinson disease): PD

Sostanza nera: SN

Parkinson autosomico recessivo giovanile (Autosomal juvenile Parkinson): AJP

Locus coeruleus: LC

Sostanza nera pars compacta: Snpc

Dopamina: DA

Sostanza nera pars reticolata: SNpr

Noradrenalina: NA

Neuromelanina: NM

Area ventrale tegmentale (Ventral tegmental area): VTA

Morbo di Alzheimer (Alzheimer disease): AD

1-metil-4-fenil-4-propionossipiperidina: MPPP

1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina: MPTP

Monoamminossidasi B: MAO B

Trasportatore della dopamina: DAT

Specie reattive dell'ossigeno (Reactive oxygen species): ROS

3,4-diidrossi-l-fenilalanina: DOPA

Acido 2-3 pirrolo dicarbossilico: PDCA

Acido 2,3,5 tricarbossilico: PTCA

Acido 3-4 tiazolo dicarbossilico: TDCA

Acido 2,3,5 tiazolo dicarbossilico: TTCA

Cisteinil-dopamina: Cys-DA

3-aminoisomero: 3-AHPEA

4-aminoisomero: 4-AHPEA

Cromatografia liquida ad alta prestazione (High performance liquid chromatography): HPLC

HPLC con rilevatore elettrochimico (HPLC-electrochemical detection): HPLC-EC

HPLC con rilevatore spettrofotometrico (HPLC-UV detection): HPLC-UV

Cisteinil-DOPA: Cys-DOPA

Tirosina idrossilasi: TH

Acido 3,4 diidrossi-fenil-acetico: DOPAC

Catecol-o-metil-transferasi: COMT

Acido omovanillico: HVA

Metanfetamine: METH

Cisteina: Cys

Dopamin-chinone: DAQ

Glutazione: GSH

Diidrobentiazina: DHBT-1

3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]propano-sulfonato: CHAPS

Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato: Tris

Trifluoroetano: TFE

Spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida (Liquid chromatography-mass spectrometry): LC-MS

Resina ammino-fenilboronato (Phenyl-amminoboronate): PBA

Non legato: NL

Primo lavaggio: L1

Ultimo lavaggio: UL

Eluizione: E

Glutathionil-dopamina: GSH-DA

Acido trifluoroacetico: TFA

Acido etilendiamminotetraacetico: EDTA

Sodio dodecil-solfato: SDS

RIASSUNTO

Il morbo di Parkinson è una malattia neurodegenerativa che colpisce prevalentemente le aree cerebrali motorie. E' causato inizialmente dalla degenerazione dei neuroni della sostanza nera e del locus coeruleus, due aree catecolaminergiche. Nei neuroni di entrambe le aree è presente un pigmento chiamato neuromelanina che si accumula con il progredire dell'età. Le catecolammine libere nel citoplasma sono molto reattive e possono sia polimerizzare, andando a costituire il core della neuromelanina stessa, sia legarsi a molecole nucleofile che si trovano nel citoplasma, tra cui cisteine o residui di cisteine presenti nelle catene peptiche. Il legame tra la dopamina e i residui di cisteina rischia di inattivare la funzione della proteina, e rappresenta quindi un potenziale fattore di rischio per la vita cellulare. In questo lavoro sono state estratte le proteine di sostanza nera e putamen umani per determinare se nei tessuti cerebrali umani sono presenti addotti catecolamine-proteine. La frazione proteica è stata caricata su una resina di fenil-boronato, che lega i dioli in modo reversibile pH-dipendente. Questo sistema permette di isolare eventuali proteine dopaminate da una miscela. Gli eluati della resina sono stati idrolizzati e analizzati in HPLC per rilevare la presenza di eventuale cisteinil-dopamina. Per ognuna delle due aree sono stati confrontati tre soggetti di età compresa tra 52 e 89 anni. In nessuna frazione di nessuna delle due aree è stata trovata cisteinil-dopamina proveniente dalle proteine idrolizzate. E' possibile ipotizzare che nei tessuti cerebrali umani la dopamina in eccesso venga immagazinata nella neuromelanina e che quindi non sia libera di reagire con le proteine, oppure che la dopamina si leghi alle proteine ma che queste vengano eliminate dal sistema ubiquitina-proteasoma, o incorporate nella struttura della neuromelanina e vadano a costituire la parte peptidica del pigmento.

ABSTRACT

Parkinson disease is a neurodegenerative disorder that results primarily from the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra and locus coeruleus. In both areas neurons contain a melanic pigment, called neuromelanin. This pigment accumulates linearly during aging and originates from an excess of free cytosolic dopamine. Dopamine is the most reactive catecholamine and, when is free in the cytosol, can easily oxidize to reactive quinone. Dopamine-quinone can polymerize and form the neuromelanin core or bind nucleophilic species like free cysteine, glutathione, or cysteine found in protein. Because of cysteine is often localized in the active enzymatic site, the addition of dopamine-quinone to cysteine may alter the protein function. In this way dopamine can be a potential neurotoxic factor for the cellular life. In order to verify if dopamine-protein adducts are present in human cerebral tissue, we extracted and analysed the protein from human substantia nigra and putamen. The proteins extracted from tissue were incubated with a amino-phenyl boronate resin (that selectively bind cis-diols present on dopamine) to isolate hypothetical dopaminated proteins. The elutes were hydrolyzed and analysed by HPLC. In both samples we haven't observed the presence of cysteinyl-dopamine adducts. On the base of these results we can hypothesize that: 1) excess of dopamine in human brain tissue is stored in neuromelanin and isn't able to react with the proteins; 2) dopamine binds the protein but the adducts are removed by ubiquitin-proteasome system or included in neuromelanin structure forming the peptidic component of the pigment.

1 INTRODUZIONE

1.1 Il morbo di Parkinson: introduzione

Il morbo di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa che colpisce le vie motorie, causata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici della sostanza nera (SN). E' stato descritto per la prima volta da James Parkinson nel 1817 [1] ed attualmente è la seconda malattia neurodegenerativa dopo l'Alzheimer. L'età media di insorgenza è intorno ai 55 anni, tranne nei rari casi di Parkinson giovanile, Parkinson autosomico recessivo giovanile (AJP) in cui i primi sintomi si registrano a circa 30 anni. I casi in cui la malattia è dovuta a mutazioni genetiche sono solo il 5%; per tutti gli altri casi si parla di PD idiopatico, del quale le cause sono ancora in gran parte sconosciute. La comprensione della eziologia della malattia è ostacolata dal fatto che al momento della comparsa dei primi sintomi è già avvenuta la perdita di circa il 60% dei neuroni dopaminergici nigrali e di circa l'80% dei neuroni del putamen, con un grave ritardo sugli effettivi fenomeni che portano alla comparsa del morbo [2].

Il PD è caratterizzato da tre sintomi principali: tremore, bradicinesia e rigidità muscolare. Tra gli effetti iniziali della malattia si può avere la perdita quasi totale del senso dell'olfatto. Successivamente possono comparire i primi tremori alle mani che consistono in piccoli movimenti rotatori ripetuti. Il tremore si manifesta a riposo e per questo viene detto di tipo statico. Si attenua durante l'esecuzione dei movimenti e si esalta negli stati d'ansia. Inizialmente consiste in movimento oscillatori di parti del corpo, mentre con l'aggravarsi della malattia il tremore si può estendere a tutto il corpo. La bradicinesia è lentezza nella esecuzione dei movimenti e nella difficoltà ad iniziarne di nuovi, da cui deriva instabilità posturale, sensazione di cadere e esecuzione di movimenti involontari che allungano l'esecuzione del movimento volontario. La rigidità muscolare causa difficoltà a iniziare il movimento, che viene concluso correttamente se il paziente è aiutato [3], [4]. In stadi avanzati

della malattia possono aggiungersi al quadro complessivo difficoltà a parlare, demenza e depressione [5].

A livello anatomo-patologico la caratteristica principale del PD è la presenza di inclusioni citoplasmatiche chiamate corpi di Lewy (fig 1.1). Sono stati descritti per la prima volta da Lewy, da cui prendono il nome nel 1912. Si tratta di corpi tondeggianti di diametro variabile, compreso tra 8 e 30 μm , fatti da fibre di proteine aggregate. Si accumulano principalmente nella SN, ma si possono trovare anche in aree della corteccia e nelle fibre olfattive. Studi di immunistochemica hanno mostrato che la principale componente dei corpi di Lewy è una proteina chiamata α sinucleina.

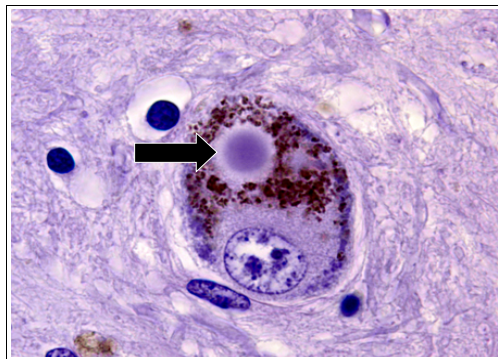


Fig 1.1: neurone con un corpo di Lewy, indicato dalla freccia.

1.2 Aree colpite

Nel corso del PD vengono colpiti prevalentemente i neuroni catecolaminergici: in primo luogo degenerano quelli della Sostanza Nera, con gravi danni per la via nigro-striatale, e successivamente quelli del Locus Coeruleus (LC).

La SN è divisibile in due parti: la pars compacta (SNpc), che utilizza come neurotrasmettitore la dopamina (DA), e la pars reticolata (SNpr), GABAergica. La Snpc appare di colore scuro, ed è costituita da neuroni intensamente pigmentati.

Nella SNpr i neuroni pigmentati sono meno numerosi e meno pigmentati. Nel corso della malattia degenera solo la SNpc, mentre la SNr non è interessata dal decorso della malattia. La SNpc riceve impulsi da aree corticali, in particolar modo da quelle associative, e proietta al putamen, e al caudato, attraverso cui interviene sulla attività dei nuclei talamici. La via nigro-striatale è un nodo fondamentale per il controllo del movimento: interviene nella via diretta e nella via indiretta di controllo dei nuclei del talamo che proiettano alla corteccia premotoria. La degenerazione della SNpc provoca una inibizione della via diretta e una mancata inibizione della via indiretta: in entrambi i casi il risultato è che vengono fortemente inibiti i nuclei del talamo che eccitano la corteccia. La mancanza del segnale da parte di quest'area corticale provoca quindi dei disturbi nel controllo del movimento: non nella loro programmazione, ma piuttosto nella loro coordinazione.

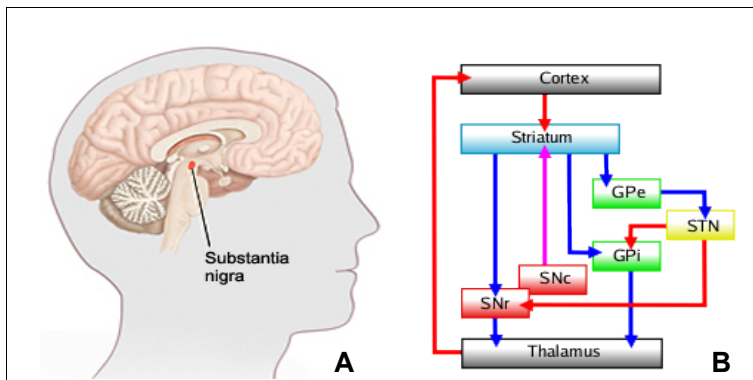


Fig 2: A) Localizzazione della SN; B) Proiezioni e afferenze

Il LC si trova nella posizione rostrale del mesencefalo, a livello del quarto ventricolo del cervelletto ed utilizza noradrenalina (NA) come trasmettitore. Le proiezioni discendenti sono dirette verso i neuroni delle corna ventrali, di quelle intermedie e di quelle dorsali, e le ascendenti verso il cervelletto, l'ipotalamo e l'amigdala. Danni in questa area sono coinvolti in forme depressive, attacchi di panico e stati d'ansia. Il deterioramento che avviene durante il PD è probabilmente responsabile delle

forme depressive che colpiscono alcuni pazienti.

Entrambe le aree prendono il loro nome dalla presenza di un pigmento scuro che si trova all'interno dei loro neuroni: la neuromelanina (NM). E' un pigmento melanico di colore marrone-nero che si accumula nei neuroni nel corso dell'invecchiamento. La NM è in parte proprio un prodotto della ossidazione e polimerizzazione delle catecolammine [6] Vicino alla SN troviamo un'altra area dopaminergica, l' area ventrale tegmentale (Ventral tegmental area: VTA), in cui non c'è NM. La VTA si distingue dalla SN per un maggior livello del trasportatore VMAT, la proteina che trasporta la DA all'interno delle vescicole sinaptiche: poiché isola il neurotrasmettitore in un contesto in cui si ossida difficilmente, l'alta concentrazione di VMAT impedisce la formazione della NM.

Nel corso del PD muoiono progressivamente la maggior parte dei neuroni nigrali; vengono colpiti soprattutto quelli contenenti maggior quantità di neuromelanina mentre quelli meno pigmentati sopravvivono in numero maggiore [7]. I neuroni della VTA invece difficilmente vengono colpiti dalla malattia, nonostante siano anch'essi dopaminergici.

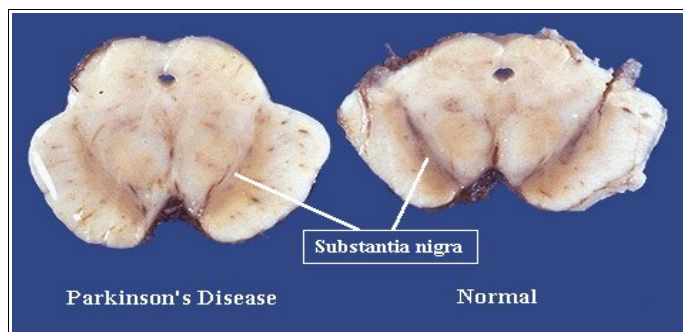


Fig.1.3: Perdita di pigmentazione della SN in un paziente parkinsoniano, dovuta alla morte dei neuroni contenenti NM

1.3 Etiologia del morbo di Parkinson

Le cause del morbo di Parkinson sono ancora in gran parte sconosciute: solo il 5 % dei casi è riconducibile a un pattern genetico dominante o recessivo [8] mentre la maggior parte dei casi sono di tipo sporadico. Attualmente il principale rischio osservato per lo sviluppo della malattia è l'invecchiamento. Si sta studiando molto per capire se ci sono delle vie metaboliche comuni che vengono danneggiate in grado di dare conto delle forme di PD.

1.3.1 Geni coinvolti

Anche se i casi di PD genetico sono molto rari, per i ricercatori è interessante studiarne le vie metaboliche. Nel morbo di Alzheimer (AD) per esempio i geni responsabili sono coinvolti in uno stesso pattern metabolico che, danneggiato, provoca la malattia. Nel caso del PD invece i geni collegati allo sviluppo dei sintomi non sono chiaramente collegati tra di loro, ma si spera che lo studio di queste vie possa fornire indicazioni più chiare anche sui casi di PD idiopatico. Attualmente sono stati identificati 15 loci suscettibili (identificati con la sigla PARK) per 11 geni. Di questi i più importanti sono il gene per l' α -sinucleina e LRRK2, e DJ-1, PINK 1, e la parkina, associati alle forme recessive.

1.3.1.1 α -Sinucleina

L' α -sinucleina è una proteina di 140 aminoacidi abbondantemente espressa nel cervello e in piccole quantità nel miocardio, tessuto connettivo, milza, prostata, tiroide, pancreas e piastrine [9]. Nei neuroni è generalmente associata alla membrana pre-sinaptica [10] ma nonostante sia studiata da molti anni non si conosce ancora del tutto la sua funzione: si associa alle membrane e sembra che possa stabilizzare la curvatura del bilayer, si lega alle vescicole ed è capace di inattivare la fosolipasi D. Questi dati suggeriscono che l' α -sinucleina sia coinvolta nella regolazione del rilascio delle vescicole sinaptiche [11] e in particolar modo di

quelle della dopamina [12]. La proteina si trova fisiologicamente come monomero solubile, ma la sua caratteristica è che tende facilmente ad aggregare e formare fibrille. La patogenicità dell' α -sinucleina è infatti legata alla tendenza ad aggregarsi in particolari condizioni ed è stata identificata nelle placche amiloidi di pazienti affetti da Alzheimer [13], [14].

Nel 1996 Polymeropoulos e collaboratori trovarono una mutazione sul cromosoma 4 in soggetti con PD con una età di insorgenza media intorno a 55 anni e un anno più tardi è stato dimostrato che la responsabile è una mutazione missenso A53T nel gene dell' α -sinucleina [15]. Studi di immunocistochemica successivi hanno rilevato che la forma fibrillare di questa proteina è la maggior componente dei corpi di Lewy, e questo ha acceso grande interesse nei confronti di questo gene [16]. Mutazioni che lo riguardano sono state dimostrate anche per altre malattie, che collettivamente prendono il nome di sinucleopatie [17]. In particolar modo è stato osservato che la maggior parte delle mutazioni dannose a carico del gene hanno come conseguenza una sua maggiore espressione: le mutazioni su promotore collegate alla patologia sono mutazioni che fanno aumentare i livelli della proteina, e le famiglie che hanno duplicazioni o triplicazioni del gene sono soggette a un abbassamento dell'età di insorgenza della malattia [18], [19], [20].

Come accennato la citotossicità della α -sinucleina è legata alla sua capacità di polimerizzare, ed infatti le forme mutate A30P e A53T hanno anche una maggiore tendenza a disporsi in aggregati simili ai corpi di Lewy [21] rispetto alla forma wild type. E' stato ipotizzato che la forma più pericolosa di aggregazione siano le protofibrille, la cui forma ricorda una classe di porine batteriche che potrebbero indurre una inappropriata permeabilizzazione delle membrane. A conferma di questa teoria le forme mutate A30P e A53T inducono una particolare capacità di formare le protofibrille. Non è ancora chiaro quali siano i fattori che inducono la aggregazione della α -sinucleina nel PD e in generale nelle sinucleopatie. E' interessante notare che la attività della α -sinucleina è legata alla presenza della DA; la sua patogenicità si manifesta particolarmente nelle cellule dopaminergiche, probabilmente a causa delle specie radicaliche che si liberano nella biosintesi del

neurotrasmettitore. Gli studi condotti sulla interazione tra la proteina e l'ambiente cellulare suggeriscono che l' aggregazione avviene in presenza della DA in modo mediato da specie radicaliche dell'ossigeno. Le catecolammine, e in particolare la dopamina, possono reagire con l'alfa sinucleina in modo da stabilizzare le protofibrille [22]. In questo modo aumenterebbero l'azione tossica della proteina, impedendo che le fibrille si leghino negli aggregati meno reattivi. Sostanze tossiche come il paraquat e il rotenone inducono l'aggregazione, attraverso l'inattivazione della attività mitocondriale [23]. Anche altri fattori di stress ossidativo giocano un ruolo importante in questo processo. Con l'avanzare dell'età aumentano i livelli di α -sinucleina nella citoplasma, e le forme danneggiate che la cellula non riesce a eliminare si possono accumulare in modo patologico [24]. Il modo in cui l' α -sinucleina esercita la sua azione citotossica non è ancora stato delucidato completamente. Molti dati portano a pensare che possa danneggiare l'attività del sistema ubiquitina-proteasoma: la sovraespressione della α -sinucleina in colture cellulari implica un abbassamento della tolleranza a inibitori del proteasoma, suggerendo che l'eccesso della proteina porti già un danno al sistema [25]. L'azione della proteina è diretta comunque verso molti pathway, perchè è coinvolta nel danno all'attività della autofagia mediata da chaperoni [26], ai mitocondri [27], a difetti nel traffico cellulare [28] e a un aumento di stress ossidativo. La sovraespressione della proteina inibisce anche l'espressione della VMAT [29]

1.3.1.2 Parkina

Il gene della Parkina è stato individuato perchè associato alla forma giovanile di Parkinson in una famiglia giapponese [30] Mutazioni sul gene della parkina sono relativamente diffuse nelle forme di Parkinson familiare. La parkina è capace di legare un numero singolarmente alto di substrati, e si pensa che funzioni come una E3 ligasi, e quindi che entri in gioco nel pathway della ubiquitina-proteasoma [31]. La gran parte delle mutazioni sul gene portano a una perdita di funzione della proteina, che non sarebbe così più capace di legare correttamente i substrati: la

mancata eliminazione delle proteine target portebbe portare a un accumulo di sostanze neurotossiche nella cellula. Sono stati creati dei topi knock out per la parkina, ma contrariamente a quello che ci si aspettava questi topi non hanno sviluppato una forma Parkinson-simile, ma hanno mostrato livelli ridotti di proteine coinvolte nella protezione dei mitocondri da stress ossidativo [32], [33]. La conseguenza di queste caratteristiche è una maggior sensibilità allo stress ossidativo, che aumenta con l'età, e una minore efficienza della attività mitocondriale. Viceversa, la sovraespressione della parkina in colture cellulari conferisce protezione nei confronti di agenti che inducono una apoptosi mediata da danni mitocondriali [34]. E' possibile che la induzione della malattia legata a mutazioni sul gene della parkina sia legata al danno mitocondriale che si manifesta con il progredire dell'età. La parkina è in grado di proteggere la cellula dalla tossicità indotta dalla DA, con un meccanismo ancora non del tutto noto [35]. In colture cellulari la sovraespressione della parkina controbilancia il danno indotto dalla sovraespressione della α -sinucleina. Le due proteine non sono in grado di interagire, secondo quello che sappiamo attualmente, ma questi dati indicano che l'azione di entrambe potrebbe confluire in un unico pathway.

1.3.1.3 Altri geni

UCHL1, PINK1, DJ1 e LRRK2 sono altri geni interessanti per la comprensione della malattia, trovati associati allo sviluppo di PD idi tipo familiare. In particolare DJ1 è una proteina che ha funzione di neuroprotezione nei confronti dello stress ossidativo: ad esempio elimina l'azione tossica del perossido di idrogeno attraverso l'ossidazione dei residui di cisteina della sua struttura [36]. In vitro condizioni di stress ossidativo inducono l'aggregazione di DJ1 e parkina [37]. Probabilmente la mutazione sul gene impedisce la funzione di neuroprotezione della proteina.

1.4 Patogenesi del morbo di Parkinson

A livello cellulare il PD è caratterizzato da tre principali caratteristiche: aggregazione proteica, disfunzioni mitocondriali e stress ossidativo [2]. Il processo di invecchiamento può esacerbare tutti questi processi, perchè nel tempo i sistemi

di riparazione dei danni e di eliminazione delle proteine non foldate diventano meno efficienti. La mancata rimozione provoca un accumulo dei danni all'interno della cellula che se raggiungono un livello intollerabile per la cellula ne provocano la morte.

1.4.1 Aggregazione proteica

Una importante caratteristica del PD è la presenza di aggregati proteici nel citosol. Sono aggregati formati da proteine non correttamente foldate o ossidate, e possono essere precipitazioni di proteine polimerizzate, o secondo alcuni rappresentano un modo di sottrarre dall'ambiente cellulare le proteine potenzialmente dannose [38]. Si trovano maggiormente nell'età anziana [39] poichè con l'invecchiamento il sistema di degradazione delle proteine danneggiate diventa meno efficiente e quindi i danni possono accumularsi. I neuroni sono cellule particolarmente sensibili a tali problemi in quanto post mitotiche. Gli aggregati proteici possono danneggiare la cellula deformandone la forma e intralciando i corretti scambi all'interno della stessa, oppure legando proteine importanti per la vita cellulare impedendone la funzione. Non è ben noto cosa faccia partire inizialmente la aggregazione proteica. Lo stress ossidativo è probabilmente una delle cause: la presenza di proteine ossidate aumenta con l'invecchiamento ed è provato che i corpi di Lewy contengono prevalentemente α -sinucleina modificata dall'attacco di radicali o altre forme di stress ossidativo [40].

1.4.2 Disfunzioni mitocondriali e tossine

Nel 1982 dei giovani che facevano uso di droghe svilupparono una malattia simile al Parkinson. Nel tentativo di sintetizzare l'1-metil-4-fenil-4-propionossipiperidina (MPPP) era stato prodotto per sbaglio anche una sostanza di scarto chiamata 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP), responsabile della malattia a cui sono adatti incontro [41]. L'MPTP riesce a attraversare facilmente la barriera ematoencefalica [42], entra nel cervello e viene degradato dalla monoamminossidasi B (MAO B) delle cellule gliali a MPP⁺, che è la vera sostanza tossica del processo. L'MPP⁺ è in grado di legarsi al trasportatore della DA (DAT) e

entra nei neuroni della SN [43]. A questo punto può agire attraverso tre vie: può interagire con vari enzimi, specialmente quelli che hanno cariche negative [44], può mimare il substrato della VMAT e entrare nelle vescicole sinaptiche [45] oppure entra nei mitocondri e interagisce con il complesso I mitocondriale [46]. Quando viene internalizzato nelle vescicole la sua tossicità è ridotta: la sovraespressione della VMAT rende cellule in coltura resistenti all'azione dell'MPP+ [45]. La bassa espressione della VMAT è uno di motivi per cui i neuroni della SN sono i più sensibili all'azione della MPP+; infatti le altre cellule che esprimono la DAT sono meno soggette all'azione di questa tossina. La via che porta l'MPP+ a inibire il complesso I mitocondriale è quello più tossico per la vita cellulare. Quando il complesso I mitocondriale viene fortemente inibito aumenta la produzione di radicali dell'ossigeno (ROS) che sono estremamente dannosi per la cellula [47], e diminuisce la produzione di ATP, bloccando gran parte dei processi che avvengono nella cellula [48]. L'abbassamento dei livelli di ATP provoca anche una non corretta internalizzazione della DA nelle vescicole sinaptiche [49]. La presenza della DA nel citosol è un ulteriore fattore di rischio perchè può facilmente interagire con i ROS. La presenza della NM è un altro fattore che rende i neuroni della SN particolarmente sensibili a questa tossina: come abbiamo visto infatti la NM accumula ferro che può interagire con i ROS prodotti conseguentemente all'intossicazione da MPTP [50]. La somministrazione ripetuta nel tempo di basse dosi di MPTP fa sviluppare nelle cavie una sindrome molto simile al PD, in cui c'è una degenerazione maggiore delle cellule della SNpc rispetto a quelle della VTA, una perdita prevalente dei terminali che proiettano allo striato e la formazione di aggregati proteici di α -sinucleina simili ai corpi di Lewy [51]. Questi aspetti hanno reso l'MPTP la tossina prevalentemente usata nei modelli di studio del PD. Esistono altre tossine che inducono malattie Parkinson-simili. Il paraquat è un erbicida usato fino a qualche anno fa, di struttura simile all' MPP+. Agisce aumentando la produzione di radicali superossido e induce la formazione di aggregati di α -sinucleina [52]. Anche il rotenone è una tossina simile all' MPP+ e agisce nello stesso sito inibendo il complesso I mitocondriale [23], [53]. A differenza dell'MPP+ però il rotenone è in grado di entrare facilmente anche in altri tipi cellulari, ma

induce comunque una perdita selettiva dei neuroni della SN [54]. Questo dato dimostra una maggiore sensibilità delle cellule dopaminergiche all'inibizione del complesso I e alla cascata di eventi che ne consegue. In seguito alla scoperta della azione dell'MPTP e delle altre tossine è stato evidente che le disfunzioni mitocondriali hanno un ruolo importante nella patogenesi del PD. I dati sperimentali dimostrano che i mitocondri dei terminali sinaptici sono più sensibili di quelli dei corpi cellulari alla inibizione del complesso I mitocondriale [55]. Cellule ibride in cui vengono trasferiti mitocondri di SN di soggetti parkinsoniani sono soggette a apoptosi come le cellule di provenienza [56]. Tutto questo dimostra che il PD è in larga parte dovuto a inefficienza dei mitocondri, ma è molto interessante notare che questo è parte di una ampia rete di fattori: la eliminazione del gene dell' α -sinucleina ad esempio rende insensibili alla presenza dell'MPTP le cellule della SN, suggerendo che la riduzione di efficacia del complesso I abbia bisogno di altri effettori per portare alla morte cellulare [57], [58].

1.4.3 Stress ossidativo

Una caratteristica importante che si trova nel cervello di soggetti affetti da PD è la elevata presenza di marcatori di stress ossidativo [40]. Il metabolismo mitocondriale produce fisiologicamente specie reattive dell'ossigeno, che nel tempo possono danneggiare parti cellulari. Se l'attività mitocondriale viene ulteriormente rallentata da tossine o altri tipi di inibitori la produzione di ROS aumenta. Quando la cellula invecchia si abbassano le difese e la possibilità di riparare i danni diminuisce e i neuroni sono molto sensibili a questo tipo di danno. In particolare, i neuroni della SN sono particolarmente soggetti a causa dei bassi livelli di glutatione riscontrati [59]. Nei soggetti PD inoltre è stato evidenziato un'aumento del ferro reattivo [60]. Sebbene non sia ancora noto cosa provochi questo aumento degli ioni del ferro, la loro presenza catalizza delle reazioni di ossido riduzione potenzialmente pericolose per la cellula.

1.5 La neuromelanina

1.5.1 Struttura della NM

La NM è un pigmento di colore scuro che si trova principalmente nei neuroni della SNpc e del LC e prende il nome dalla somiglianza con la melanina cutanea [50]. I neuroni pigmentati sono maggiormente vulnerabili nel PD rispetto ai non pigmentati, ma quelli poco pigmentati sono relativamente più sensibili di quelli molto pigmentati. La NM si accumula nei neuroni a partire da tre anni di età e la sua concentrazione cresce col passare del tempo [61]. Si trova in organelli di circa 0,5-3 µm circondati da una doppia membrana, il che suggerisce che derivino da un processo di autofagocitosi [62]. All'interno degli organelli la microscopia a forza atomica mostra è costituita da subunità sferiche di 30 nm di diametro circa, che hanno un core di feomelanina e una superficie di eumelanina, con rapporto feomelanina: eumelanina 1:3 [63]. La parte melanica è disposta in strati paralleli tra loro, simili alla struttura della grafite, composti da gruppi indolo e da benzotiazine, legati a catene alifatiche e a gruppi peptidici [64] [65]. Gli anelli benzenici sono responsabili della colorazione scura propria del pigmento. Al core della molecola si legano gruppi peptidici e lipidi, che rappresentano rispettivamente il 15 e il 30% della totalità della molecola [66]. I peptidi possono derivare da un legame tra la NM e proteine oppure dalla reazione tra DA e cisteina durante il processo di sintesi della NM stessa. La struttura della NM è molto complessa e non è ancora stata del tutto delucidata dato che il legame di tipi molecolari diversi complica lo studio della struttura, e anche il meccanismo della sua sintesi non è completamente chiaro. La NM è oggetto di studi perchè si pensa che sia collegata con il processo di morte cellulare anche se sicuramente non è l'unica protagonista dato che si accumula fisiologicamente nelle cellule.

1.5.2 Precursori della NM

Il core della NM è sintetizzato a partire dalle catecolammine. La somministrazione diretta di DA a cellule in colture può risultare letale, ma se viene fornita 3,4-

diidrossi-l-fenilalanina (DOPA) a cellule PC12 questa viene internalizzata e viene prodotta DA. E' stato dimostrato che la somministrazione di DOPA per 30 giorni a queste cellule provoca la formazione di strutture intracellulari morfologicamente simili alla NM umana. Se oltre alla DOPA viene fornita anche la N-acetil cisteina, che previene la formazione di chinoni extracellulari viene comunque trovato pigmento nelle cellule. Al contrario, se viene somministrato anche un chelante del ferro la sintesi del pigmento melanico è quasi nulla. Quando le cellule vengono indotte a esprimere alti livelli di VMAT 2 la DA è internalizzata nelle vescicole e anche in questo caso la sintesi del pigmento viene ridotta [67]. La estrema somiglianza del pigmento con la NM umana induce a pensare che la NM segua la stessa via di formazione. Questi esperimenti dimostrano che la sintesi della NM umana avviene a partire dalle catecolammine, quando queste sono libere nel citosol e quindi più facilmente indotte a ossidarsi e a polimerizzare. La presenza di ferro reattivo è fondamentale perché avvenga questo processo come dimostrato dal fatto che la sottrazione degli ioni ferro con agenti chelanti inibisce la sintesi della NM. Si pensa che la sintesi della NM sia un meccanismo per sottrarre dall'ambiente cellulare l'eccesso di catecolammine non internalizzate nelle vescicole sinaptiche, a causa della bassa espressione di VMAT2 nelle cellule nigrali. Nel corso della formazione della NM probabilmente i chinoni delle catecolammine legano facilmente la cisteina libera, e il prodotto di questa reazione può ciclizzare a formare le benzotiazine, che si trovano in abbondanza nella NM. La composizione della NM è stata studiata attraverso metodi degradativi [68]. La ossidazione della NM con H_2O_2 ha come prodotti l'acido 2-3 pirrolo dicarbossilico (PDCA) e l'acido 2,3,5 tricarbossilico (PTCA), quando la NM deriva da DA, l'acido 3-4 tiazolo dicarbossilico (TDCA) e l'acido 2,3,5 tiazolo dicarbossilico (TTCA) per la derivazione da cisteinil-dopamina (Cys-DA). L'idrolisi con HI produce il 3-aminoisomero (3-AHPEA) e il 4-aminoisomero (4-AHPEA). La degradazione e l'analisi in HPLC ha permesso di rilevare e quantificare il rapporto di questi prodotti, dimostrando che la NM isolata da SN proviene in larga parte dalla polimerizzazione della DA, e che incorpora per il 21-25 % Cys-DA [68]. La NM è stata isolata e caratterizzata anche in altre aree cerebrali [63]. La degradazione della NM con un

metodo ossidativo o riduttivo ha chiarito la diversità tra le NM delle varie aree in composizione di DA, DOPA e di cis-addotti di entrambe le specie. Nei pigmenti provenienti da putamen, cervelletto e corteccia premotoria la NM è costituita prevalentemente da cisteinil-DOPA (Cys-DOPA) e non da DA. Quindi mentre nella SN c'è un'alta componente derivata dalla DA e una parte della Cys-DA, nelle altre aree prevale la componente derivata dalla DOPA e dalla Cys-DOPA [69]. La composizione della NM suggerisce che i chinoni della DA e della DOPA legati alla cisteina si legano per formare il pigmento. La sintesi della NM avrebbe quindi un ruolo protettivo, perché servirebbe per sottrarre dal citosol i chinoni, specie reattive e pericolose per la cellula.

1.5.3 Funzioni neuroprotettiva e neurotossica della NM

I gruppi indolo di cui è costituita la NM la rendono capace di legare con efficienza ioni metallici liberi e tossine cariche positivamente, quali MPTP e paraquat. Durante la patogenesi del PD aumenta in modo significativo la concentrazione degli ioni ferro reattivi all'interno della SN [70]. Non sappiamo il motivo della selettività di questo processo, ma è stato dimostrato anche che l'aumento del ferro non è accompagnato da un aumento delle ferritine, proteine che legano lo ione, che rimane disponibile [71]. Il ferro è in grado di catalizzare la reazione tra perossido di idrogeno e ione superossido con risultato lo ione idrossile. La NM ha una funzione neuroprotettiva, perché sequestra dall'ambiente cellulare diverse specie tossiche e i metalli, in particolare ferro [72]. Al tempo stesso però quando non è più in grado di trattenere queste specie a causa di un sovraccarico, il ferro diventa disponibile e quindi fonte di stress ossidativo [62]. È dimostrato inoltre che la NM liberata nell'ambiente extracellulare, come dopo la morte dei neuroni della SN, attiva la microglia scatenando un processo infiammatorio pericoloso per il tessuto [73]. La NM può quindi avere funzione neuroprotettiva o neurotossica, in modo dipendente dal contesto in cui si trova.

1.6 La dopamina

1.6.1 Sintesi e catabolismo

I neuroni della SN sintetizzano dopamina come neurotrasmettitore. Il primo step della sintesi è catalizzato dall'enzima tirosina idrossilasi (TH) a partire dalla tirosina.

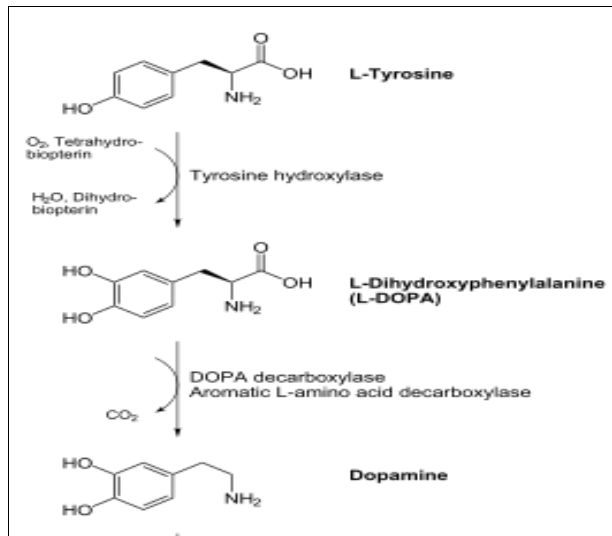


Fig 1.4: Step di sintesi della DA

Il primo intermedio di reazione che si forma è la 3,4-diidrossi-L-fenilalanina (DOPA), substrato della DOPA decarbossilasi che sintetizza la DA. A questo punto il neurotrasmettitore entra nelle vescicole sinaptiche grazie alla VMAT, un trasportatore di membrana ATPasico. All'interno delle vescicole sinaptiche il pH è mantenuto intorno a 5,5 da una pompa protonica, e l'acidità mantiene la DA in forma ridotta.

Il catabolismo della DA prevede due vie degradative. Nel primo caso la DA viene degradata dalla monoamminossidasi, un enzima che si trova sulla membrana esterna mitocondriale. Questa via produce perossido di idrogeno come scarto e acido 3,4 diidrossi-fenil-acetico (DOPAC). Nella seconda via degradativa la DA è

substrato della catecol-o-metil-transferasi (COMT) e in questo caso si forma come prodotto la 3-metossitiramina. Come vediamo dalla figura 1.5, il prodotto finale di entrambe le vie è l'acido omovanillico (HVA). Il catabolismo stesso della DA, producendo H_2O_2 , è in parte responsabile dell'elevato stress ossidativo nelle cellule della SN.

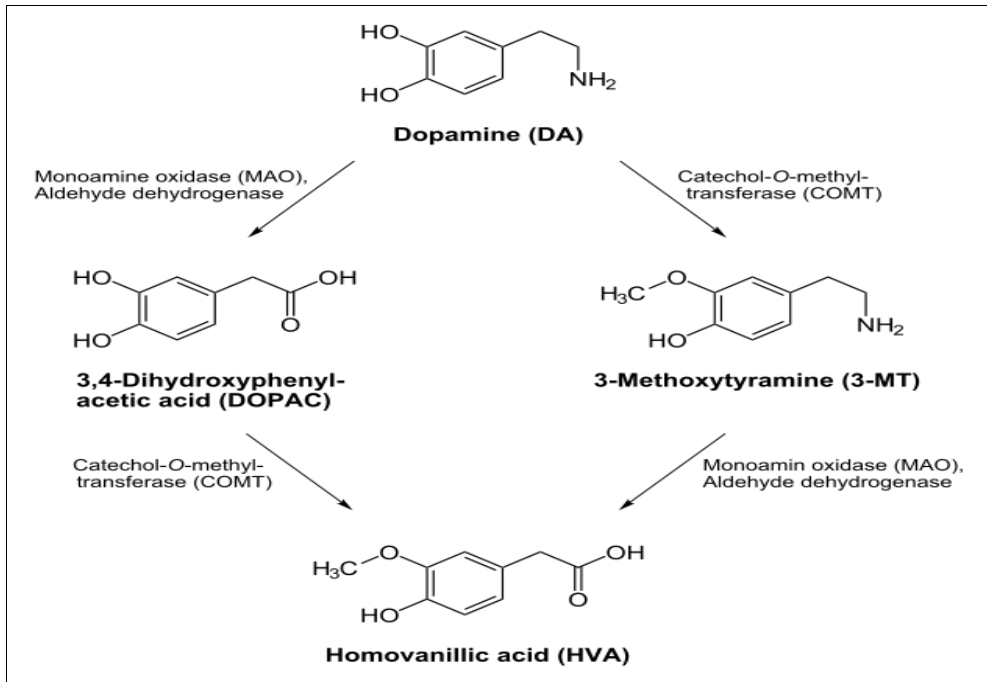


Fig 1.5: Catabolismo della DA

1.6.2 Tossicità della metanfetamina dopamina-mediata

La somministrazione di metanfetamine (METH) produce una neurodegenerazione in cui vengono colpiti principalmente i neuriti delle cellule dopaminergiche [74]. Le METH sono basi deboli che legano ioni H^+ e creano un disequilibrio nel gradiente tra l'interno e l'esterno delle vescicole sinaptiche con conseguente fuoriuscita del neurotrasmettitore nel citosol [75]. Le cavie eterozigoti per la delezione della VMAT sono maggiormente sensibili all'azione della METH, il che suggerisce che la citotossicità di queste droghe sia mediata dall'azione della DA libera nel citosol [76]

La somministrazione di DA nello striato inoltre è tossica in modo dose-dipendente, per cui evidentemente la cellula non può supportare elevate dosi di DA libera.

1.6.3 Meccanismi di ossidazione della DA

La DA è la più reattiva tra le catecolammine [77]. Quando è libera nel citosol va facilmente incontro a ossidazione tramite autossidazione, ossidazione mediata da metalli o ossidazione mediata da enzimi. L'ossidazione dell'anello catecolico ha come risultato della reazione il chinone della DA (DAQ), una specie estremamente reattiva. Nella fig 1.6 è possibile vedere lo schema della reazione:

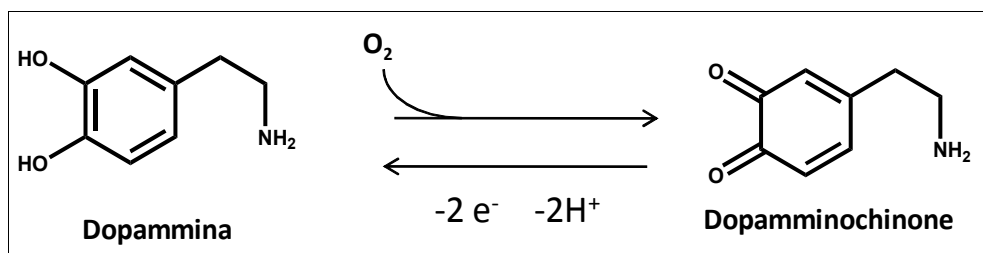


Fig 1.6: Via di formazione dei chinoni e dell'aminocromo

La DA può ossidarsi spontaneamente in presenza di ossigeno molecolare o di radicale idrossile [78]. La presenza di radicale idrossile nei neuroni nigrali è favorita proprio dal metabolismo della DA, perchè può essere un prodotto della reazione tra il perossido di idrogeno, molecola di scarto del catabolismo della DA, e ioni ferro liberi nella cellula. La reazione tra la DA e l'ossigeno invece può produrre uno ione superossido, estremamente citotossico. Dalla ossidazione stessa della DA quindi si possono formare ROS pericolosi per la vita cellulare [79]. La reazione di ossidazione è molto accelerata dalla presenza di ioni ferro o di altri metalli di transizione come manganese o rame. In particolare la specie più reattiva è il Fe³⁺ e la reazione avviene più facilmente a pH basico, dato che il Fe(OH)²⁺ è più reattivo del Fe³⁺ libero [75]. Quando sono presenti tali ioni la DA cede un elettrone al metallo, che si riduce e si forma un semichinone, successivamente si ha una

nuova ossidazione a chinone. La specie Fe^{2+} è molto reattiva e in presenza di perossido di idrogeno va incontro alla reazione di Fenton dando come risultato radicale idrossile. Questo dato è di grande importanza, perchè è noto che la presenza di ferro aumenta notevolmente nelle cellule dei soggetti parkinsoniani in confronto a tessuti di controllo [60]. La DA può anche essere ossidata da alcuni enzimi [80]. Nei melanosomi la tirosina è substrato della tirosinasi, enzima di sintesi della melanina. Nella formazione di questa si ha come intermedio il chinone della DA. E' stato trovato il mRNA della tirosinasi nelle cellule cerebrali, per cui si pensa che una piccola quantità di tirosinasi sia sintetizzata nei neuroni e che possa contribuire alla formazione dei chinoni nelle cellule [81]. Attualmente vi sono dati discordanti sulla presenza dell'enzima nelle cellule cerebrali, ma anche la prostaglandina H sintasi e altre perossidasi possono utilizzare la DA come donatore di elettroni dando come risultato specie chinoniche [82]. Vediamo che l'ossidazione della DA porta quindi alla produzione di radicali e specie tossiche per la cellula. La abbondanza di perossido di idrogeno e ioni ferrici nei neuroni nigrali fornisce un terreno fertile per l'aumento dello stress ossidativo. La formazione dei chinoni però è potenzialmente tossica per la cellula non solo in quanto fonte di ROS, ma anche perchè i chinoni stessi sono molto reattivi e possono attaccare molecole fondamentali per la vita cellulare.

1.6.4 Reattività dei chinoni della DA

Il chinone della DA è una specie molto reattiva. Può ciclizzare a dare un indolo, oppure si lega facilmente alle specie nucleofile. Le specie nucleofile maggiormente presenti nella cellula sono i tioli, sotto forma di cisteina (Cys) libera, glutatione (GSH) e residui di cisteine delle proteine [83]. I dopamin-chinoni si legano alla cisteina, dando preferenzialmente la 5-Cys-DA, e come prodotto secondario la 2-Cys-DA [77], [84], [85]. In figura 1.7 viene riportato lo schema di formazione del 5-S-cisteinil-dopamminochinone

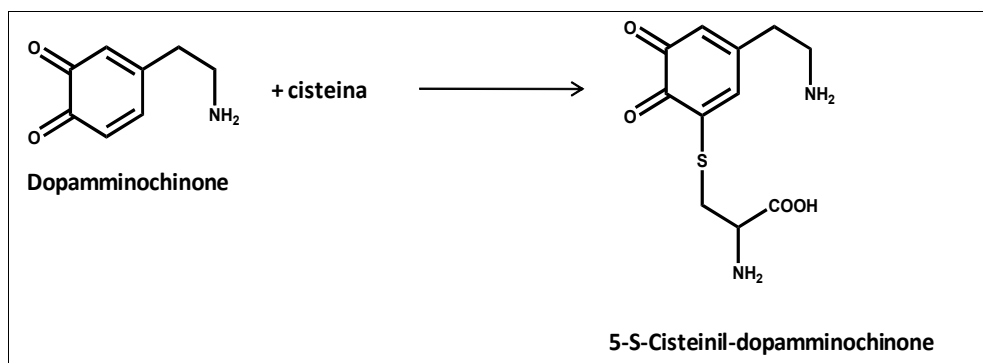


Fig 7: Formazione della 5-S-Cys-DA

La Cys-DA può essere ulteriormente ossidata e ciclizzare e formare la diidrobenzitiazina (DHBT-1) che può inibire il complesso mitocondriale I [86]. I DAQ possono reagire anche con lisine e istidine delle catene peptidiche, ma con molta meno probabilità rispetto alla cisteina [80]. Nel 1989 Fornstedt e colleghi dimostrarono la presenza di 5-Cys-DA e altri derivati della reazione tra i chinoni di altre catecolammine e derivati della DA, quali la DOPA e la DOPAC, con la cisteina, a testimonianza del fatto che queste reazioni avvengono effettivamente in vivo [83], [87]. In questo lavoro venne misurato in HPLC la concentrazione di varie catecolammine e dei loro addotti in SN, putamen e nucleo caudato umani, e la Cys-DA fu trovata largamente presente nei neuroni della SN. Nel lavoro del 1995 Spencer e colleghi ampliarono i campioni e i tipi di aree prese in esame, confrontando i livelli di Cys-DA nella SN, putamen, substantia innominata, nucleo accumbens, caudato e globo pallido [87]. Questo lavoro confermò che la 5-Cys-DA e la 5-Cys-DOPA sono presenti fisiologicamente nei tessuti di SN, putamen e substantia innominata, e che nella SN e substantia innominata di soggetti parkinsoniani aumenta la concentrazione della 5-Cys-DA [87]. La maggior parte deriva probabilmente dal legame tra il chinone e GSH, che viene degradato dalle proteasi. Dato che era stato dimostrato da questi lavori che il legame tra DA e cisteina libera avviene in vivo, i ricercatori si sono chiesti se il chinone può legarsi anche a residui di cisteina presenti nelle catene peptidiche. Il lavoro di La Voie e Hastings ha dimostrato che la somministrazione della METH induce un significativo

aumento della cistein-dopamina derivata da proteine [88]. La cisteina si trova spesso in siti attivi enzimatici e il legame covalente con il dopamin-chinone può inattivare la funzione della proteina, con gravi danni per la cellula. E' possibile che la tossicità della METH sia mediata proprio da questo processo, perchè la cosomministrazione delle droghe e di tioli, che funzionano da scavenger per i chinoni, previene la degenerazione cellulare [89], [90]. La reazione tra DA e residui di Cys delle proteine avviene sicuramente con minore efficienza a causa del maggiore ingombro sterico che impedisce alla molecola di raggiungere l'amminoacido, ma diversi lavori confermano che in vitro questo processo avviene [91].

1.6.5 Legame del dopamin-chinone alle proteine

1.6.5.1 La α -sinucleina

Dopo che i lavori precedentemente citati hanno dimostrato che può avvenire il legame tra DA e cisteina, molti lavori hanno cercato di scoprire un nesso tra il legame della DA e l'inattivazione di alcune proteine chiave del morbo di Parkinson. Come abbiamo visto l' α -sinucleina è una proteina centrale per la patogenesi del PD e il suo potenziale tossico è legato alla tendenza a formare aggregati insolubili. Si lega facilmente in protofibrille che successivamente si dispongono in fibrille. Nel 2001 Conway e collaboratori hanno dimostrato che in vitro il legame tra derivati della DA e la proteina stabilizza le protofibrille, che sono più tossiche per la cellula [22]. La condizione perchè avvenga questa interazione è che siano liberi i due gruppi -OH dell'anello catecolico, altrimenti non c'è effetto. Poichè l' α -sinucleina non contiene residui di cisteina, suggeriscono che la DA possa legarsi ad un residuo di lisina o metionina. Successivamente è stato evidenziato che la presenza della DA citosolica in un modello di lievito induce l'aggregazione della proteina e la formazione di una struttura che somiglia alle porine batteriche [92]. Questa struttura può agire come porina e rendere permeabili le membrane mitocondriali. La DA interagisce con la proteina a livello della sequenza 125-YEMPS-129, perchè la creazione di una proteina mancante di questo sito impedisce la aggregazione

[9]. La sovraespressione di α -sinucleina in cellule umane in coltura, non dopaminergiche non induce apoptosi, che avviene solo in presenza di DA [93]. La presenza contemporanea di fattori di rischio come DA e aggregazione della α -sinucleina renderebbe quindi le cellule della SN particolarmente sensibili a aumenti di stress ossidativo.

1.6.5.2 Altre proteine

La DA può legare e inattivare altre proteine. La parkina fa parte di un pathway molto importante nel PD, e contiene molti residui di Cys nella sua sequenza, il che la rende bersaglio preferenziale per l'azione della DA. La parkina infatti è sensibile a un eccesso di neurotrasmettitore libero, e in particolare la DA si lega a due residui (Cys-268 e Cys-323) liberi [94]. Il legame tra la parkina e la DA modifica la sua solubilità e ne induce l'aggregazione. In un importante lavoro del 2005 La Voie e colleghi dimostrarono che in vitro la DA inattiva l'attività della parkina [95]. Con una tecnica nuova che si avvale dell'uso di una resina di polifenilboronato, riuscirono inoltre a isolare da estratti proteici della SN di un soggetto non affetto da PD aggregati di parkina. Questo è allo stato attuale l'unico lavoro in cui sono state isolate direttamente da tessuto umano proteine modificate con DA.

L'esposizione a un eccesso di DA o di suoi metaboliti è in grado di inattivare l'attività di molti enzimi, in vitro o in coltura. Tra questi vanno annoverati la triptofano idrossilasi [96],[98], la tirosina idrossilasi [99], l' α -chetoglutarato deidrogenasi [100], la piruvato deidrogenasi [101], il trasportatore della DA [102] e la Cu, Zn-superoossido dismutasi [103]. Di particolare interesse per il nostro lavoro sono i lavori che indagano l'azione della DA sulla attività mitocondriale. La DA viene degradata dalla MAO che come abbiamo visto si trova sulla membrana. La DA può attraversare la membrana e essere ossidata dall'ossigeno molecolare presente o da ioni superossido che sfuggono al trasporto elettronico. Le catecolammine inoltre reagiscono facilmente con il ferro delle eme proteine. Nel mitocondrio quindi c'è un ambiente che favorisce particolarmente la ossidazione della DA, e le proteine target per l'azione della DAQ potrebbero essere proprio

quelle mitocondriali. Poiché le disfunzioni di questo organello sono pesantemente coinvolte con la patogenesi del PD, è stata indagata con attenzione l'azione delle catecolammine sulla vitalità dei mitocondri. L'esposizione di mitocondri di ratto a DA induce l'inibizione del complesso I e IV mitocondriale [104]. Il complesso di permeabilità mitocondriale regola il passaggio di ioni tra le membrane interne e esterne. Ha molti residui di Cys in siti attivi e la esposizione a DA ne altera l'attività [105]. In un lavoro più recente è stato dimostrato che la somministrazione di grandi quantità di DA induce dei cambiamenti nel proteoma mitocondriale di ratto[106].

2. SCOPO DEL LAVORO

Il morbo di Parkinson è la seconda malattia neurodegenerativa dell'età anziana. Colpisce prevalentemente le aree cerebrali preposte al controllo dell'attività motoria e la prima area colpita è la sostanza nera, dopaminergica e pigmentata. Le caratteristiche più importanti a livello molecolare della malattia sono la presenza di aggregati proteici, disfunzioni mitocondriali e alti livelli di stress ossidativo [2]. Una delle cause dello stress ossidativo nella SN è proprio la DA, in primo luogo perchè il suo metabolismo provoca la formazione di radicali nella cellula, e in secondo luogo perchè può ossidarsi e polimerizzare o reagire con altre molecole [107]. Per questi motivi la DA è considerata un fattore di rischio in un contesto già indebolito, in cui il processo di invecchiamento rende difficile l'eliminazione di molecole tossiche per la vita cellulare. Nella SN ci sono livelli di DA libera nel citosol più alti rispetto a altre aree dopaminergiche, a causa dei bassi livelli di espressione di VMAT, il trasportatore che internalizza il neurotrasmettitore nelle vescicole sinaptiche. Le specie ossidate della DA reagiscono facilmente con molecole nucleofile, come la cisteina libera o i residui di cisteina delle proteine. Poiché la cisteina spesso si trova nei siti attivi degli enzimi, il legame covalente con il chinone della DA potrebbe inattivare la funzione della proteina ostacolando seriamente la vita della cellula [108]. E' stato dimostrato che nella SN c'è alta concentrazione di cisteinil-DA libera, e che nei soggetti affetti la quantità aumenta rispetto ai controlli sani [87]. La induzione del rilascio della DA dalle vescicole tramite somministrazione di metanfetamine, o la somministrazione della DA a colture cellulari in quantità superiori alla sua concentrazione normale nella cellula, causano la formazione di addotti proteina-dopamina [88]. Lo scopo di questo lavoro è verificare se il legame tra DA e proteine avviene anche nei tessuti cerebrali umani in condizioni fisiologiche, capire se ci sono differenze tra tessuti diversi e se l'eventuale presenza di addotti può rappresentare un fattore di rischio. Per fare questo è stata effettuata l'estrazione della frazione proteica da SN e putamen. E' stato utilizzato un nuovo sistema basato sull'utilizzo di una resina di

fenil-boronato, capace di trattenere eventuali proteine modificate all'interno della miscela proteica. La frazione trattenuta è stata infine idrolizzata e analizzata in HPLC.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti

Tutte le soluzioni sono state preparate con acqua deionizzata Milli-Q. Tutti i reagenti sono stati acquisiti dalla Sigma-Aldrich.

3.2 Tessuti analizzati

Per effettuare questo lavoro sono stati usati tessuti cerebrali umani, sostanza nera e putamen di soggetti non affetti da morbo di Parkinson, di età compresa tra 52 e 89 anni. I tessuti sono stati prelevati da soggetti deceduti di entrambi i sessi a diverse età, che non presentavano patologie neurodegenerative. I tessuti sono stati prelevati in conformità con le norme vigenti in materia di medicina legale, immediatamente processati e congelati a -80 C fino al momento delle estrazioni proteiche. L'estrazione è stata fatta da soggetti di tre fasce di età diverse, compresa tra 50 e 70 anni, tra 70 e 80, tra 80 e 90, per effettuare un paragone e studiare se la presenza degli addotti possa variare con l'invecchiamento. La tabella 3.1 riporta le sigle e le età dei soggetti.

	50-70	70-80	80-90
sostanza nera	2010_022 (52)	2009_026 (71)	2009_019 (83)
putamen	2010_019 (60)	2009_007 (72)	2010_032 (89)

Tabella 3.1: La tabella riporta il codice utilizzato per indicare i soggetti da cui sono state fatte le estrazioni, l'età di ogni soggetto è indicata tra parentesi

3.3 Estrazione di proteine da tessuto cerebrale

La parte preliminare di questo lavoro sono stati confrontati tre diversi metodi per estrarre le proteine da tessuto:

- Soluzione contenente urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tris 30 mM e 0,8% inibitore di proteasi
- Soluzione con Tris 50 mM pH 7,4 e 0,8% inibitore di proteasi
- Soluzione trifluoroetano (TFE)-PBS (rapporto volume 1:1), e 0,8% inibitore di proteasi, pH 7,4 come indicato nel metodo di Wang [109]. L'unica modifica che abbiamo apportato è stata l'aggiunta di acido ascorbico 1 mM, per mantenere la DA in forma ridotta ed evitare la formazione di addotti mentre viene effettuata l'estrazione.

Per confrontare gli estraenti vengono pesati circa 20 mg di tessuto per volta e aggiunto l'estraente in rapporto 1:8. I tessuti sono vortexati fino alla disgregazione, e poi omogenati con il sonicatore o ultraturax. I passaggi sono effettuati mantenendo le provette in ghiaccio. L'omogenato viene centrifugato a 2200 g per 5 minuti o fino alla scomparsa del particolato, quindi viene prelevato il surnatante.

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Lowry [110].

Le estrazioni proteiche fatte per le analisi descritte nei paragrafi successivi sono state fatte utilizzando circa 300 mg di tessuto e l'estraente a base di TFE-PBS in rapporto 1:8 mg/μl.

3.4 Analisi dei frammenti proteici con LC-MS

Le proteine sono state precipitate e risospese in H₂O bidistillata. Sono state digerite over night con 4 μg di tripsina a 37 °C pH 7,5 e il digerito triptico è stato iniettato in LC-MS/MS. Gli spettri di ionizzazione di massa sono stati ottenuti

utilizzando uno spettrometro di massa a trappola ionica LCQ ADV MAX, con sorgente di ioni ESI e controllato dal software 1,3 Xcalibur (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA). Gli esperimenti ESI sono stati svolti su carica ionica positiva, alle seguenti condizioni strumentali: voltaggio della sorgente 5,0 kV, voltaggio del capillare 46 V, temperatura del capillare 210°C, voltaggio (tube lens) 55 V. L'iniezione in LC-MS/MS è stata effettuata usando il sistema di iniezione automatico Surveyor HPLC (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), con una colonna BioBasic™ C18 column, 5 µm, 2.1×150 mm. L'eluizione è stata condotta con 0.1 % HCOOH in acqua distillata (solvente A) e 0.1 % HCOOH in acetonitrile (solvente B), a un flusso pari a 0.2 ml/min; l'eluizione inizia con il 98 % del solvente A per 5 min, seguito da un gradiente lineare dal 98 % al 55 % A in 65 min. Gli spettri MS/MS ottenuti con il CID sono stati ottenuti con una ampiezza di 2Th (m/z). Per l'analisi dei frammenti peptidici lo spettrometro è stato settato in modo tale che per ogni picco in MS è stato eseguito uno zoom e un MS/MS scan sul picco più intenso dello spettro MS. Gli spettri acquisiti sono stati confrontati automaticamente con il protein database UniProtKB (www.uniprot.org) per identificare le proteine usando l'algoritmo SEQUEST® del programma Bioworks 3.1 (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Sono state cercate le modifiche sui residui di cisteina, con i seguenti criteri: cisteina + dopamina (massa aggiunta + 151); leucoamminocromo (massa + 149), 5, 6 didrossindolo (+147), 5,6 indolochinone (+145) e i loro dimeri corrispondenti [111].

3.5. Resina di fenil-boronato per l'isolamento di cis-dioli

3.5.1 Utilizzo della resina

E' stata utilizzata una resina di fenil-boronato per isolare eventuali proteine modificate dalla totalità di proteine estratte, perchè l'acido boronico ha due gruppi idrossilici che a pH basico diventano disponibili per un legame con cis-dioli,

formando un estere boronato. Il legame è covalente e reversibile a pH acido [112]. Per questo lavoro studi è stata usata la resina di aminofenil-boronato (PBA) legato a sferette di agarosio (Sigma-Aldrich, prod nos. A8312) in sospensione acquosa per trattenere le proteine di interesse.

La resina viene attivata facendo un lavaggio con 5 volumi di NaOH 0,02 M, poi con 5 volumi di acido acetico 0,05 M e infine con 10 volumi di H₂O distillata. Viene successivamente equilibrata con 50 volumi di loading buffer, composto da cloruro di sodio 150 mM, Hepes 20 mM, cloruro di magnesio 20 mM, pH 8,6. Dopo l'attivazione il campione viene applicato sulla resina e lasciato in agitazione a 4 °C per 16 ore. I lavaggi vengono effettuati con 100 volumi dello stesso buffer, aggiungendo 10 ml di soluzione per volta e lasciando in agitazione. L'eluizione è fatta con l'elution buffer: cloruro di sodio 150 mM, Hepes 20 mM, cloruro di magnesio 20 mM, pH 2,5. Vengono aggiunti alla resina circa 3 ml di elution buffer e lasciati in agitazione per circa 1 ora, dopo di che viene aggiunto ancora elution buffer fino a un totale di 5 volumi di resina impaccata. Dopo l'uso la resina viene rigenerata con 10 volumi di Buffer borato 0,1 M pH 9,8 e NaCl 1 M, buffer borato 0,1 M pH 9,8, H₂O, NaCl 2,0 M. La resina viene conservata in NaCl 1 M fino all'utilizzo successivo.

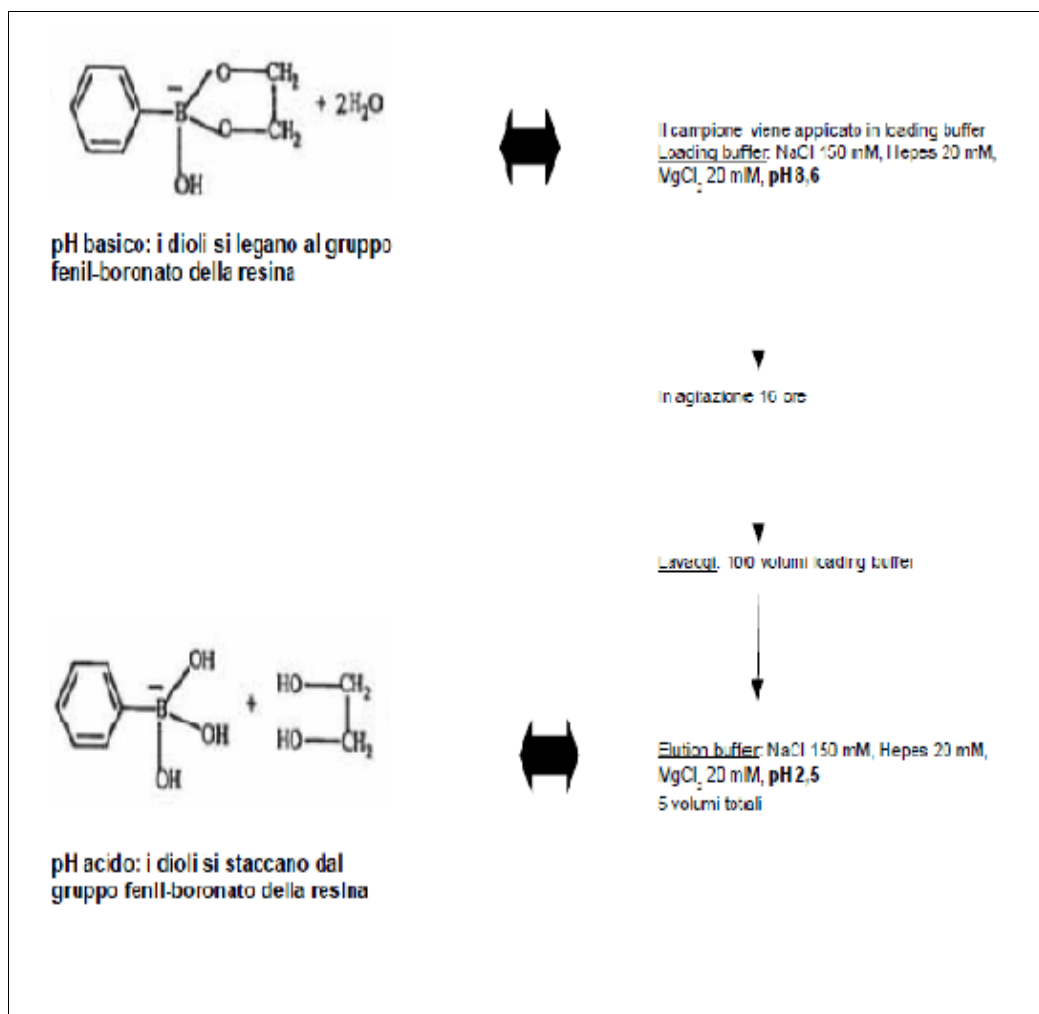


Fig. 3.1: Schema di utilizzo e funzionamento della resina PBA

3.5.2 Applicazione delle proteine sulla resina PBA

Le proteine sono estratte con la miscela TFE-PBS pH 7,4. Il surnatante della soluzione centrifugata, eliminato il particolato, è concentrato sotto vuoto. La soluzione viene diluita in loading buffer e il pH portato a 8,6. La miscela è applicata

sulla resina e il tutto è tenuto per 16 ore in agitazione a +4 C, per permettere che avvenga il legame tra i catecoli e la resina. Dopo 16 ore vengono fatti i lavaggi della resina con volume di circa 10 ml per volta di washing buffer, fino a una quantità pari a 100 volumi di resina impaccata. Viene analizzato il volume di buffer in cui è stato applicato il campione alla resina, contenente ciò che non si è legato, indicato con NL, il primo lavaggio (L1) e l'ultimo (UL). L'eluizione, che sarà indicata come frazione E, viene fatta con circa 5 volumi di elution buffer. Il volume delle frazioni viene ridotto al rotavapor prima della idrolisi.

3.6 Idrolisi delle proteine

Per studiare la presenza di amminoacidi modificati viene effettuata l'idrolisi della miscela eluita dalla colonna. Le frazioni NL, L1 ed E vengono idrolizzate in una miscela di HCl 6M, fenolo e β -mercaptoetanololo e lasciate 16 a 110 C. Con lo stesso metodo viene effettuato l'idrolisi delle molecole standard DA, Cys-DA e GSH-DA.

3.7 Sintesi degli standard

3.7.1 Cisteinil-DA

Sono stati sintetizzati gli standard di cisteinil-DA e glutationil-DA. La DA (50 mg, 0,26 mmol) è stata incubata con L-Cys (120 mg, 1,0 mmol) e una quantità catalitica di $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (~2.0 μg) in 25 ml buffer ammonio acetato (0.1 M; pH 5.8) a 25°C. Dopo essere stato in agitazione per circa 16 ore è stato evaporato il solvente e il prodotto purificato tramite HPLC a fase inversa. L'identità della molecola è stata confermata dallo spettro MS (273.3 Da = M+1) e UV (la Cys-DA

ha un assorbimento tipico a 255 e 293 nm). La concentrazione della Cys-DA è stata ricavata dall'assorbimento UV, considerando λ_{\max} 292nm e ϵ_{292} 3,000 M⁻¹cm⁻¹. [87].

3.7.2 Glutathionil-DA

Per la sintesi del glutathionil-DA (GSH-DA) la DA (4.4 mg, 2.3·10⁻³ mmol) è stata incubata con GSH (2.2 mg, 7.2·10⁻³ mmol) e una quantità catalitica di Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O (~2.0 µg) in 25 ml buffer ammonio acetato (0.1 M; pH 5.8) a 25°C. Dopo essere stato in agitazione per circa 16 ore è stato evaporato il solvente e il prodotto purificato tramite HPLC a fase inversa. L'identità del coniugato è stata verificata con MS (459.2 Da = M+1) e UV. La λ_{\max} del GSH-DA è a 256 e 291 nm (ϵ a pH 5,8 = 1,850 M⁻¹cm⁻¹)[87]. La molecola viene purificata con HPLC a fase inversa e ne viene calcolata la concentrazione.

3.8 Estrazione della Cys DA libera da tessuto

Una parte dei tessuti è stata usata per determinare la concentrazione delle catecolammine totali. Per ogni misura sono stati pesati circa 30 mg di tessuto a cui è stato aggiunto il buffer di lisi, composto da HClO₄ 0,1 M, acido ascorbico (10 µg/ml) e isoproterenolo come standard interno (0,1 µg/ml), in rapporto 1:20. I tessuti vengono omogenati con l'ultraturax a 20500 rotazioni al minuto per circa 10 secondi. L'omogenato viene centrifugato per 10 minuti a 14500 g. e il surnatante viene recuperato e iniettato in HPLC-EC.

3.9 Analisi in HPLC delle catecolammine libere, degli standard e degli idrolizzati

3.9.1 HPLC-UV

Gli standard sono analizzati in HPLC-UV utilizzando uno strumento Jasco MD-1510 con detector spettrofotometrico, avente una colonna semipreparativa SupelcosilTM LC18 a fase inversa (5 µm, 4.6×250 mm). L'eluizione viene fatta con

quantità crescenti di acetonitrile, partendo da H₂O contenente 0,1 acido trifluoroacetico (TFA) per 15 minuti, seguito da un gradiente lineare che in 20 minuti raggiunge il 100% di acetonitrile contenente 0,1% TFA. La velocità di flusso è 0,8 ml/min. La analisi dell'eluato è fatta nel range tra 200 e 800.

3.9.2 HPLC-EC

Per l'analisi completa degli standard, degli idrolizzati e delle catecolammine libere abbiamo utilizzato un HPLC con rivelatore amperometrico. Il sistema di HPLC consiste in una pompa singola, una valvola di iniezione e una colonna C18 (250 x 4.6 mm) Hypersil RPC18 (Thermo). Il sistema di rilevazione consiste in una cella contenente il working electrode e un elettrodo di riferimento Ag/AgCl. Il potenziale è settato a +0.75 V contro l'elettrodo di riferimento e la sensibilità è 10 nA. L'integratore è collegato a un pc (Perkin Elmer modello 1020). La fase mobile è costituita da acetato di sodio 50 mM, EDTA 0,05 mM, eptansolfonato 0,7 mM, metanolo 6,5% (pH 2,35). La velocità del flusso di lavoro è 1,7 ml/min.

3.10 Analisi dati per la Cys-DA libera

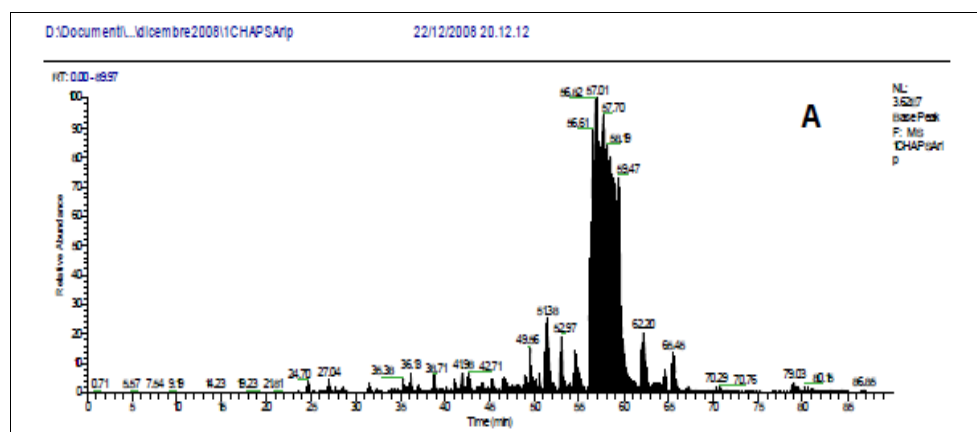
Nel buffer di lisi è stato inserito isoproterenolo come standard interno, per cui la concentrazione di catecolammine per tessuto è stata normalizzata come rapporto tra l'area della catecolamina considerata e l'area dell'isoproterenolo stesso, per correggerla rispetto alla perdita di standard durante l'estrazione. Per questo motivo la quantità di Cys-DA libera nel tessuto è riportata come rapporto tra le due aree.

4.RISULTATI

4.1 Estrazioni proteiche e analisi in LC-MS

Nella parte iniziale di questo lavoro sono stati presi in esame più metodi di estrazione proteica per raggiungere quello più adatto ai fini di questa ricerca. Sono state fatte delle estrazioni con tre diversi tipi di estraenti, CHAPS, Tris 50 mM e TFE-PBS, il contenuto proteico è stato quantificato con il metodo di Lowry e i lisati proteici ottenuti sono stati digeriti e analizzati in LC-MS.

Il residuo di CHAPS non è eliminato completamente nemmeno in seguito a precipitazioni proteiche e lavaggi e produce un segnale molto intenso che in LC-MS copre parte dei picchi dei peptidi, ed è stato quindi escluso per le estrazioni successive. L'estrazione con Tris 50 mM ha una resa quantitativa media di circa 40 µg proteine per mg di tessuto utilizzato, mentre quella con TFE-PBS 30 µg/mg. Il confronto tra le analisi LC-MS dei digeriti triptici degli estratti proteici ottenuti con Tris 50 mM e TFE-PBS mostrano che il cromatogramma del digerito triptico dell'estratto con TFE mostra una maggiore ricchezza di peptidi. In fig 4.1 sono riportati i cromatogrammi LC-MS delle analisi sui tre estraenti diversi.



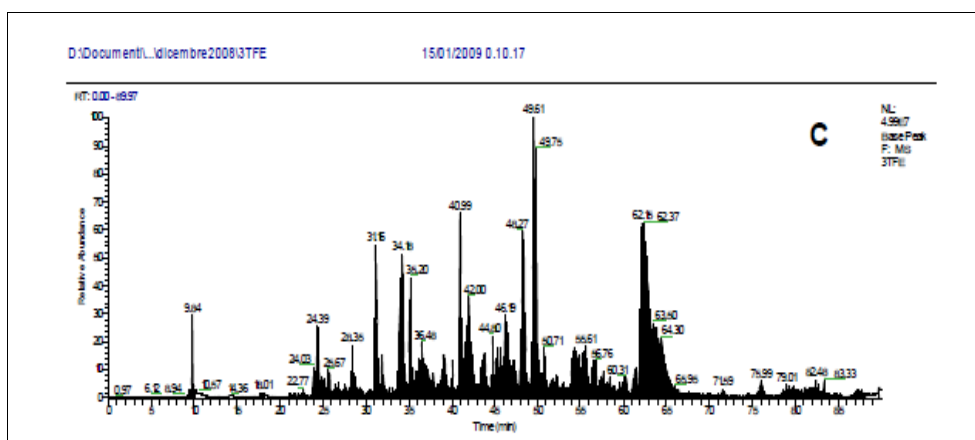
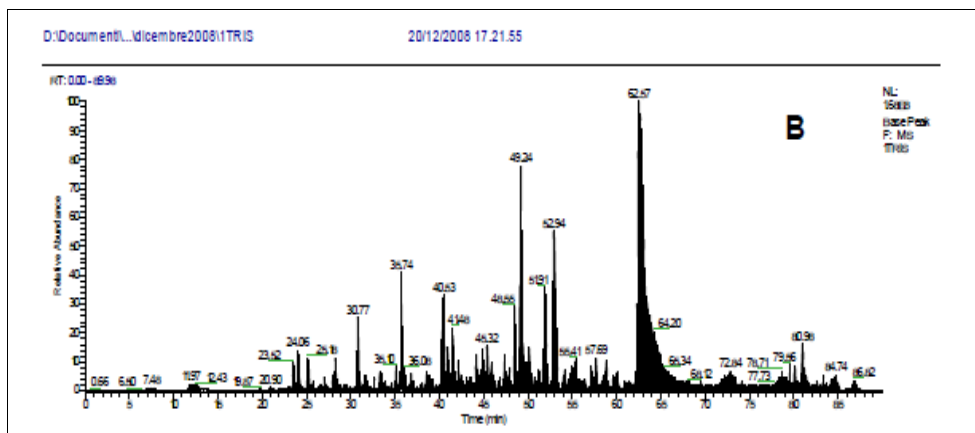


Fig.4.1: Cromatogrammi dei peptidi analizzati ottenuti da putamen. A: miscela proteica ottenuta con l'estrazione con CHAPS 4%; B: estrazione con Tris; C: estrazione con TFE

L'estrazione fatta con TFE-PBS permette di avere il miglior rapporto tra resa quantitativa e buona risoluzione del segnale LC-MS, e questa soluzione è stata quindi utilizzata per tutte le estrazioni successive.

Nel corso delle analisi LC-MS sono state cercate modifiche apportate dal legame sui residui di cisteina, come: cisteina + dopamina (massa aggiunta + 151);

leucoamminocromo (massa + 149), 5, 6 didrossindolo (+147), 5,6 indolochinone (+145) e i loro dimeri corrispondenti ma non sono state trovate in nessun estratto proteico.

4.2 Utilizzo della resina PBA

Le analisi in LC-MS non hanno permesso di rilevare proteine dopaminate: è possibile che siano presenti in bassa percentuale, e quindi potrebbero essere coperte dal segnale dei peptidi più abbondanti. Si è reso quindi necessario utilizzare un metodo che permettesse di isolare dalla miscela proteica solo le proteine dopaminate per poterle studiare meglio e identificarle. A questo scopo è stata utilizzata una resina PBA normalmente usata per isolare dioli in soluzione. In primo luogo è stata verificata la capacità della resina di legare le molecole standard, quali Cys-DA e GSH-DA, e di discriminare la presenza all'interno di una miscela proteica. La resina è stata poi utilizzata per isolare eventuali proteine modificate dagli estratti proteici dei tessuti cerebrali.

4.2.1 Verifica della capacità di legame e di sensibilità della resina

4.2.1.1 Cys-DA

Al fine di verificare la capacità della resina di legare amminoacidi dopaminati è stata sintetizzata Cys-DA e purificata da HPLC. In fig.4.2 viene mostrato il cromatogramma HPLC-EC della Cys-DA purificata a cui è stata aggiunta DA per mostrare i diversi tempi di ritenzione.

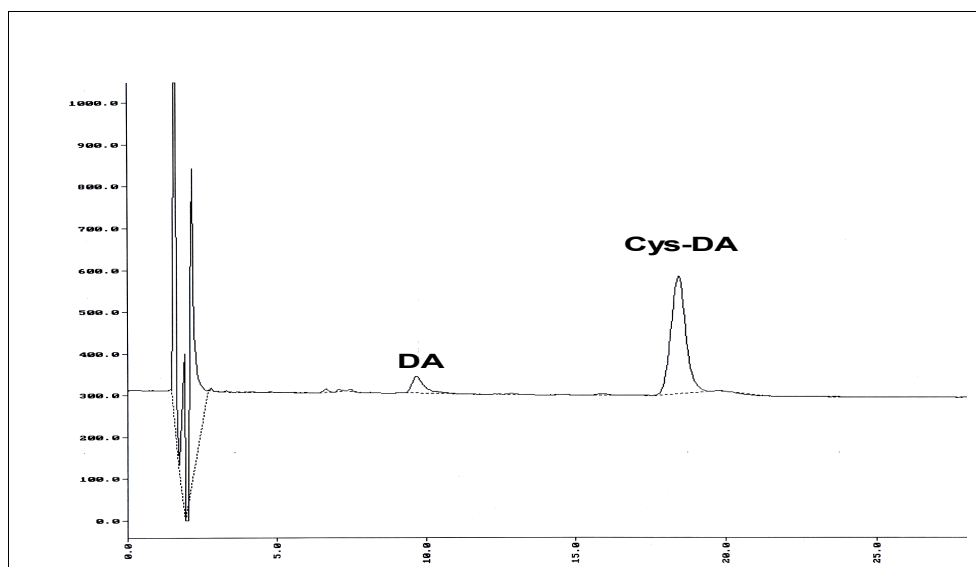


Fig. 4.2: Cromatogramma HPLC-EC della Cys-DA e della DA

La molecola è stata caricata sulla resina PBA. L'analisi della eluizione mostra che si lega alla resina e si trova per la quasi totalità (>90%) nella eluizione (dati non mostrati).

4.2.1.2 GSH-DA

E' stato sintetizzato GSH-DA e purificato con HPLC-UV. La concentrazione è stata calcolata tramite lo spettro UV usando la ϵ_{292} $3,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (λ_{max} 292nm). Il GSH-DA è stato mescolato a un largo eccesso di GSH, in rapporto 1:10. La miscela di GSH/GSH-DA è stata caricata sulla resina per verificare la capacità della resina di trattenere molecole dopaminate presenti in bassa percentuale all'interno di una miscela. Di seguito sono mostrati i cromatogrammi della HPLC-EC del GSH-DA purificato, del non legato e dell'eluato.

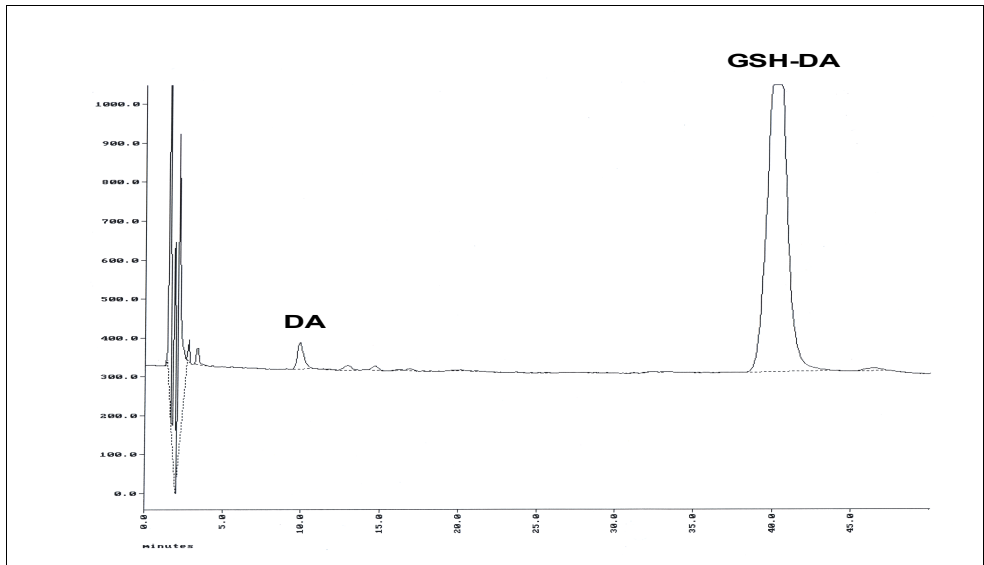


Fig. 4.3: GSH-DA. Una piccola parte di DA rimane nella soluzione

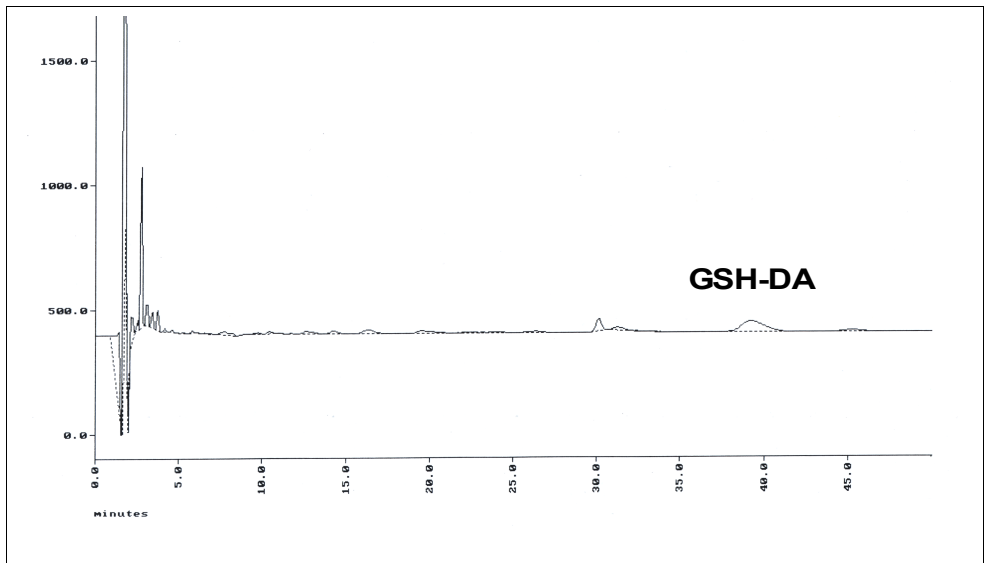


Fig. 4.4: NL del GSH-DA applicato alla resina.

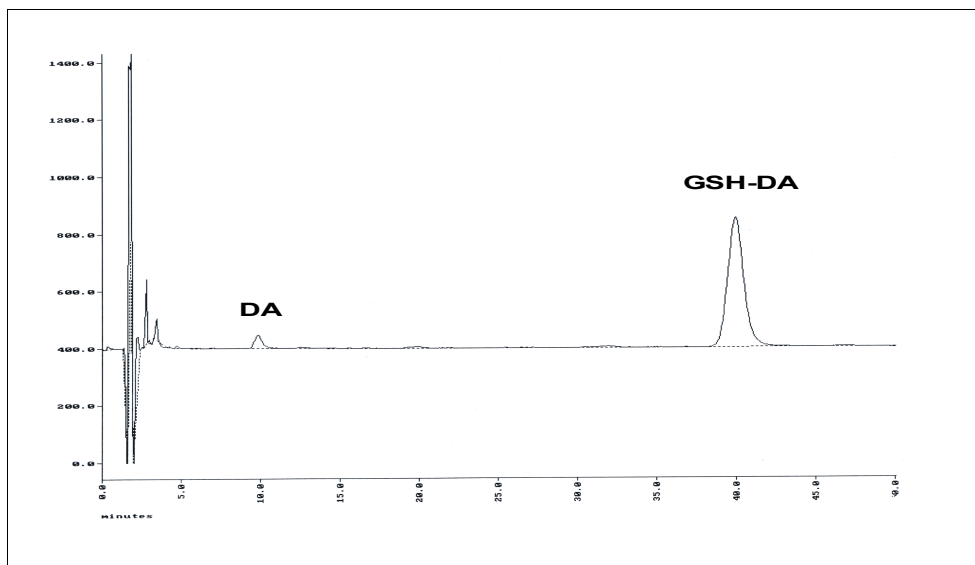


Fig. 4.5: Eluizione del GSH-DA applicato alla resina. E' visibile anche una piccola quantità di DA.

Le due soluzioni sono state portate alla stessa concentrazione, quindi i due picchi sono immediatamente confrontabili.

Calcolando la concentrazione del GSH-DA rispetto al totale caricato sulla resina si può verificare che nella eluizione viene recuperato il 90,46% di GSH-DA totale. Questo dimostra che la resina PBA è in grado di legare con grande efficienza i composti dopaminati.

4.2.1.3 Analisi della estrazione proteica con standard interno

E' stata fatta una estrazione proteica da uno dei campioni di putamen aggiungendo alla miscela di estrazione anche una quantità nota di una miscela di DA e GSH-DA. L'estrazione è stata condotta normalmente e applicata alla resina per verificare se con questo metodo è possibile separare i composti dopaminati da un omogenato di tessuto. Le frazioni NL ed E sono state idrolizzate e analizzate in HPLC-EC. In fig 4.6 viene mostrato il cromatogramma della miscela DA/GSH-DA che è stata

aggiunta all'estrante, il NL ed E. L'analisi ha permesso di identificare le molecole standard nella eluzione

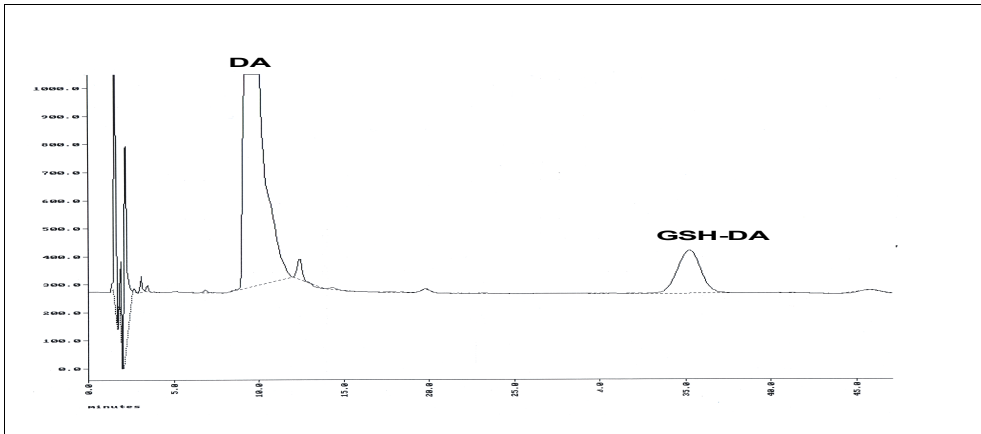


Fig. 4.6: Cromatogramma della miscela DA/GSH-DA aggiunta alla estrazione

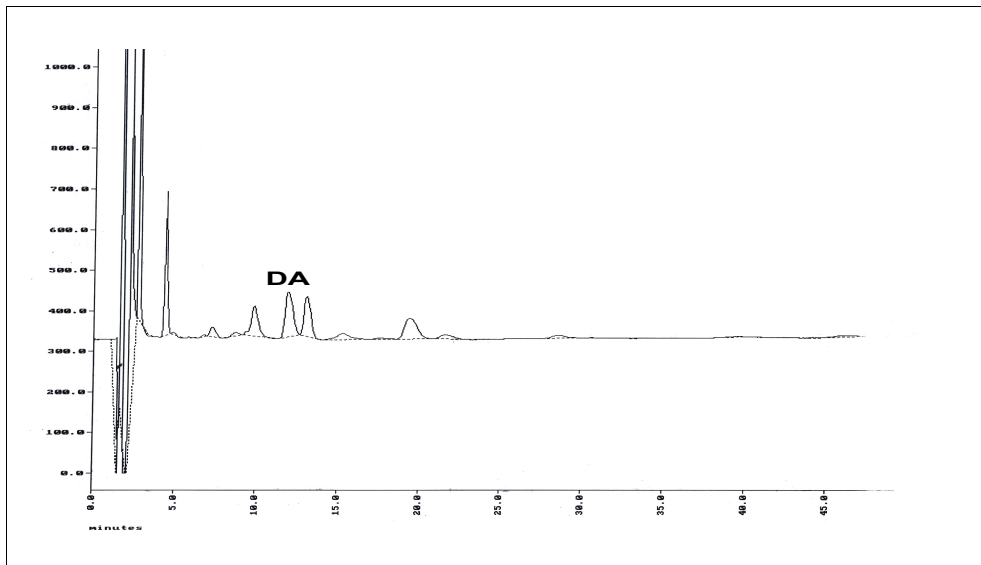


Fig. 4.7: NL della estrazione con DA/GSH-DA. E' visibile il picco della DA

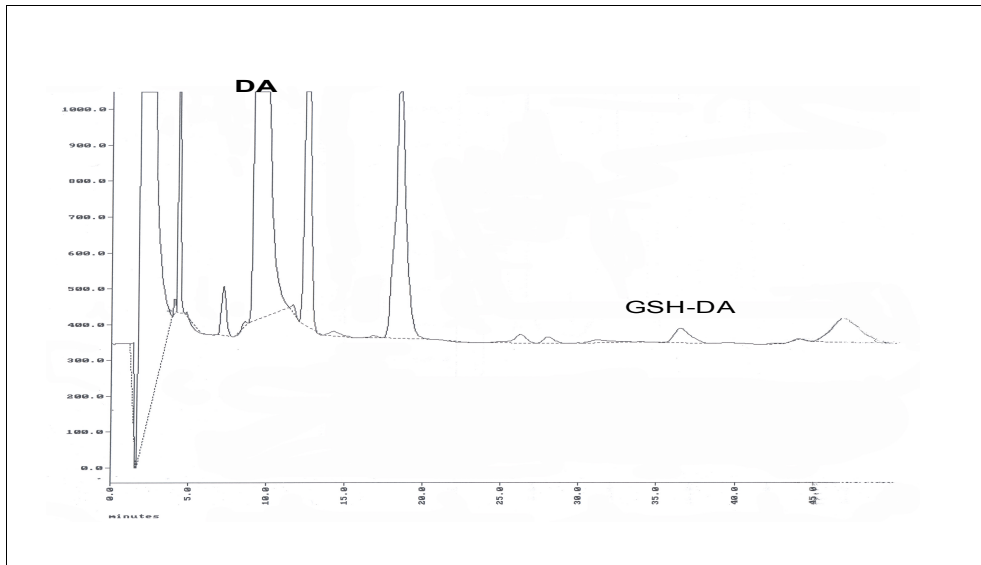
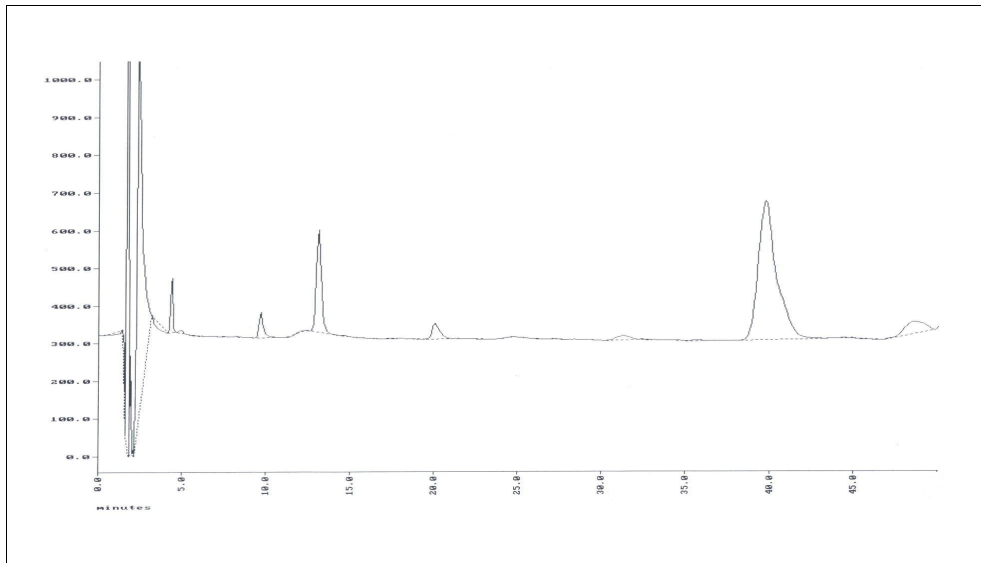


Fig. 4.8: Eluizione della estrazione fatta con DA/GSH-DA. Si vedono i picchi di entrambi gli standard

Queste dati dimostrano che la resina PBA usata nel corso di questo lavoro è in grado di legare selettivamente i composti dopaminati, di selezionarli all'interno di una miscela, e che vengono isolati anche da una miscela complessa come un lisato proteico da tessuto cerebrale.

4.2.2 Analisi degli idrolizzati delle proteine caricate sulla resina

Il risultato delle idrolisi delle frazioni NL, L1, E di ciascuna analisi è stato iniettato in HPLC-EC per cercare la presenza di addotti cisteina-dopamina. Sono riportati di seguito i risultati delle analisi dei tessuti, dei tre tessuti di sostanza nera e i tre putamen. In ogni cromatogramma è stato evidenziato con un cerchio il tempo in cui dovrebbe uscire la Cys-DA. Viene riportato in figura 4.9 il cromatogramma del buffer di eluizione idrolizzato, da usare come riferimento per i cromatogrammi successivi.



4.9: Cromatogramma della idrolisi del buffer di eluizione. Il buffer viene usato come riferimento per le analisi successive

4.2.2.1 Sostanza nera

4.2.2.1.1 SN 2010_022

Questa analisi viene fatta sull'estratto proteico della SN di un soggetto di 52 anni. Dopo l'estrazione proteica il lisato viene centrifugato per eliminare residui e viene prelevato il surnatante. In questo caso viene idrolizzato anche il pellet e analizzato HPLC-EC, per escludere che eventuali proteine modificate rimangano nel pellet. Nella fig 4.10, 4.11, 4.12 vengono riportati i cromatogrammi delle analisi

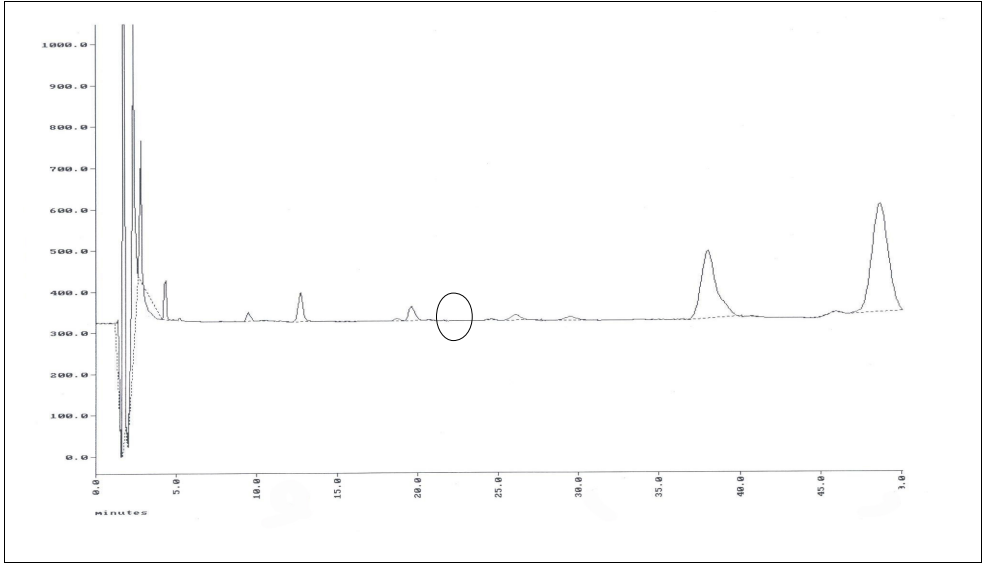


Fig. 4.10: Pellet dell'estrazione da SN 2010_022

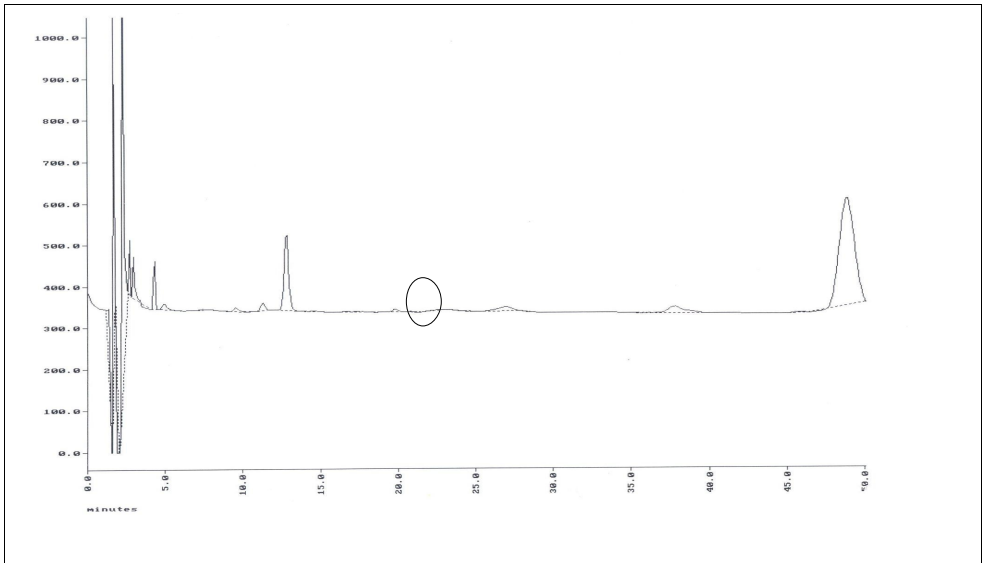


Fig. 4.11: NL estrazione SN 2010_022

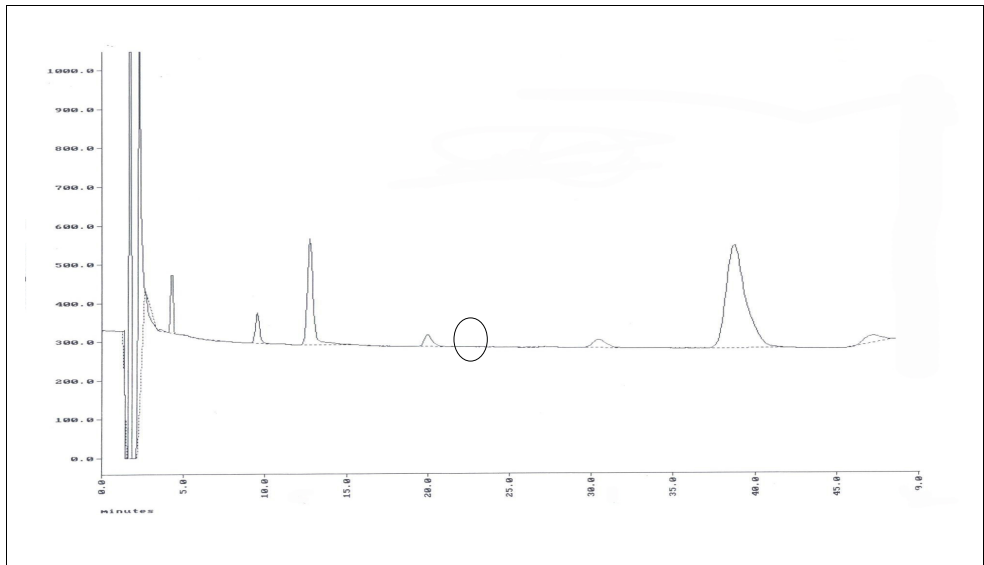


Fig. 4.12: Eluizione SN 2010_02

In nessuna frazione sono presenti residui di cisteina dopaminata.

Confrontando il cromatogramma della eluizione e del buffer di eluizione idrolizzato risulta che nella eluizione non è rilevata la presenza degli addotti cisteinil-DA.

4.2.2.1.2 SN 2009_026

In questa analisi l'estrazione proteica è stata fatta dalla sostanza nera di un soggetto di 71 anni. In fig 4.13 viene riportato il cromatogramma del NL e nella 4.14 quello della eluizione

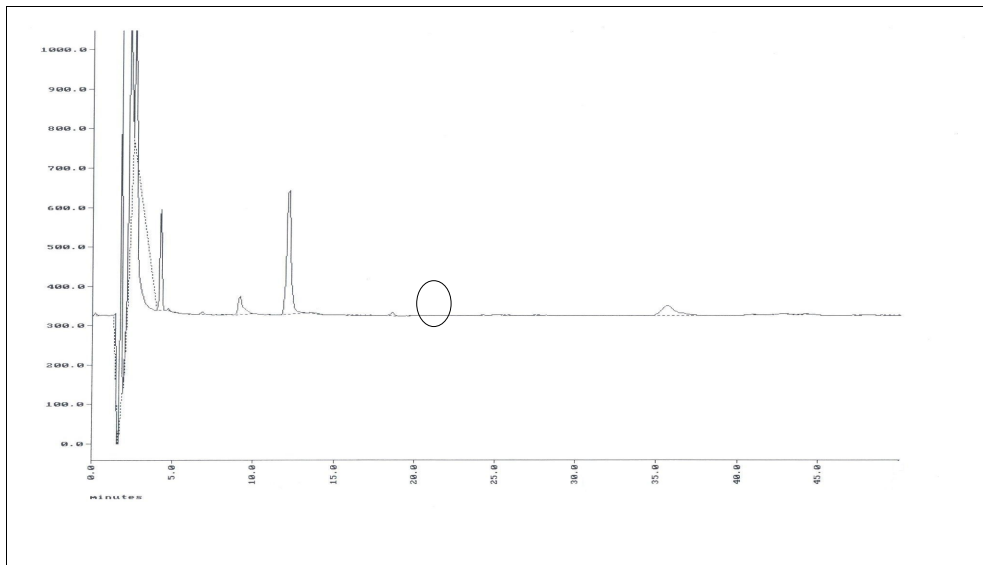


Fig 4.13 Cromatogramma della NL della SN 2009_026

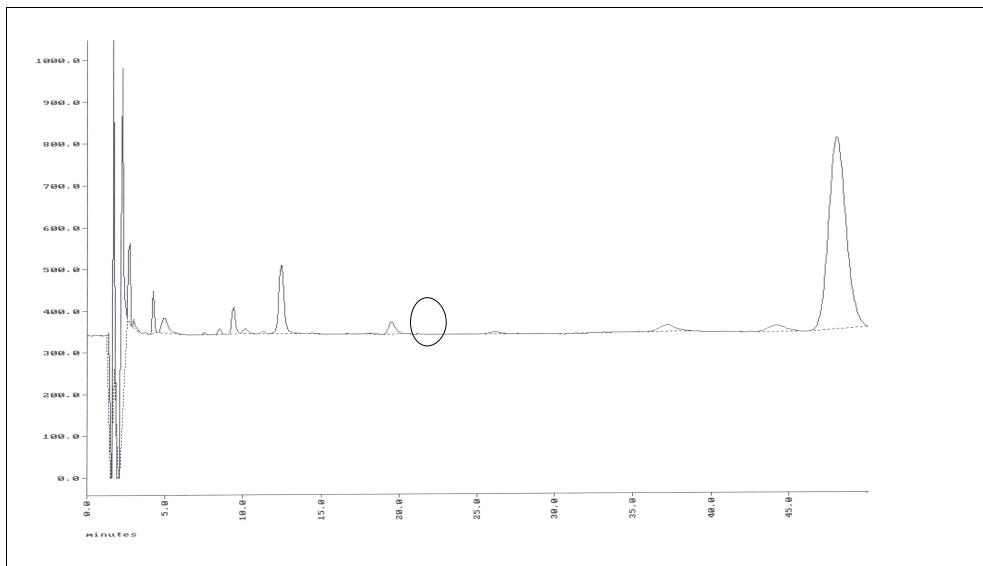


Fig. 4.14: Eluizione SN 2009_026

4.2.2.1.3 SN 2009_019

In questo caso l'estrazione proteica è stata fatta dalla SN di un soggetto di 83 anni.

In fig 4.15 viene mostrato il risultato dell'idrolisi del NL, nella 4.16 della L1 e ella 4.17 della eluizione.

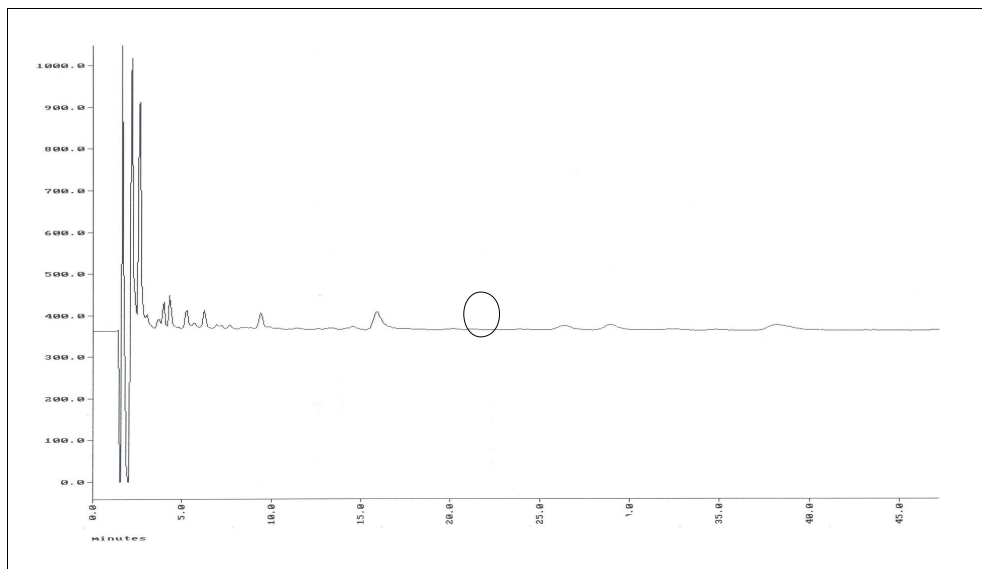


Fig 4.15: Idrolisi del NL della sostanza nera SN 2009_019

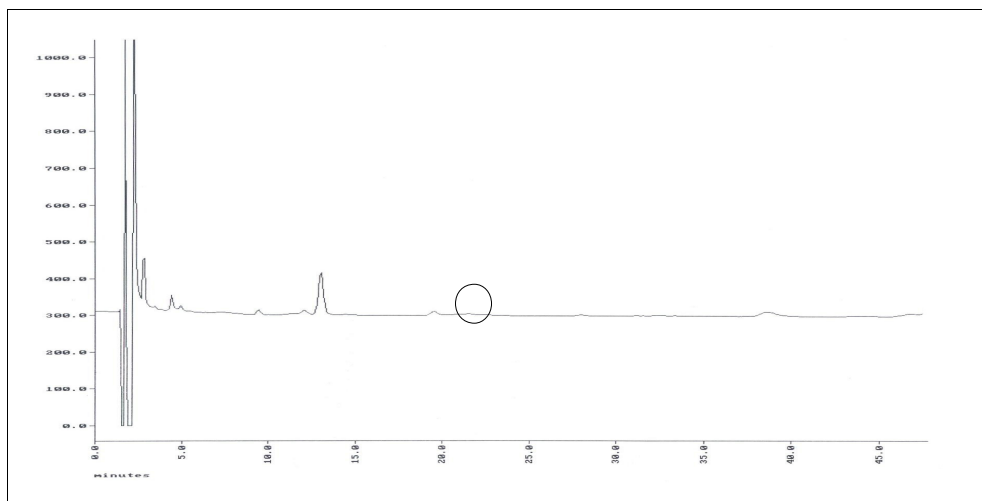


Fig 4.16: Idrolisi del L1 SN 2009_019

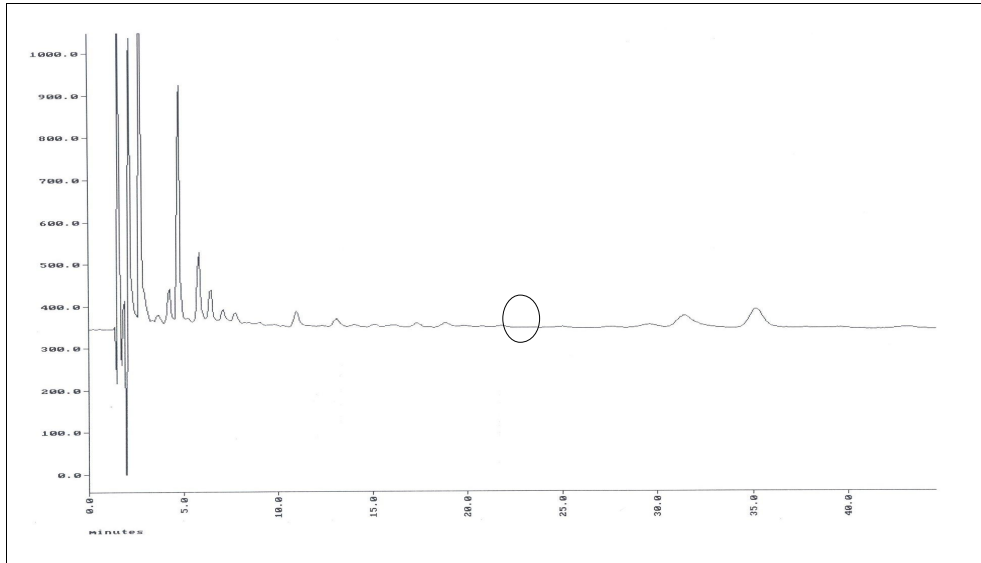


Fig 4.17: Idrolisi della eluizione SN 2009_019

In nessuna di queste frazioni è presente Cys-DA.

4.2.2.2 Putamen

Il putamen riceve le afferenze della SN, pertanto vi si trova molta DA. Per questo motivo è stato scelto come confronto con la SN.

4.2.2.2.1 PUT 2010_019

In questo caso l'estrazione è stata fatta da un soggetto di 60 anni. Di seguito sono riportati i cromatogrammi del NL (fig. 4.18) e della eluizione (fig 4.19)

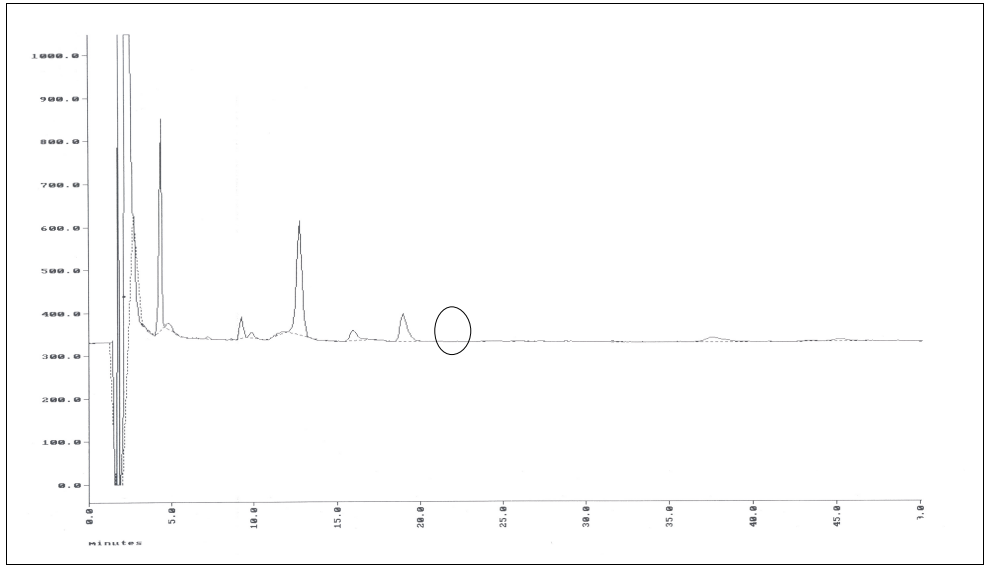


Fig 4.18 NL putamen 2010_019

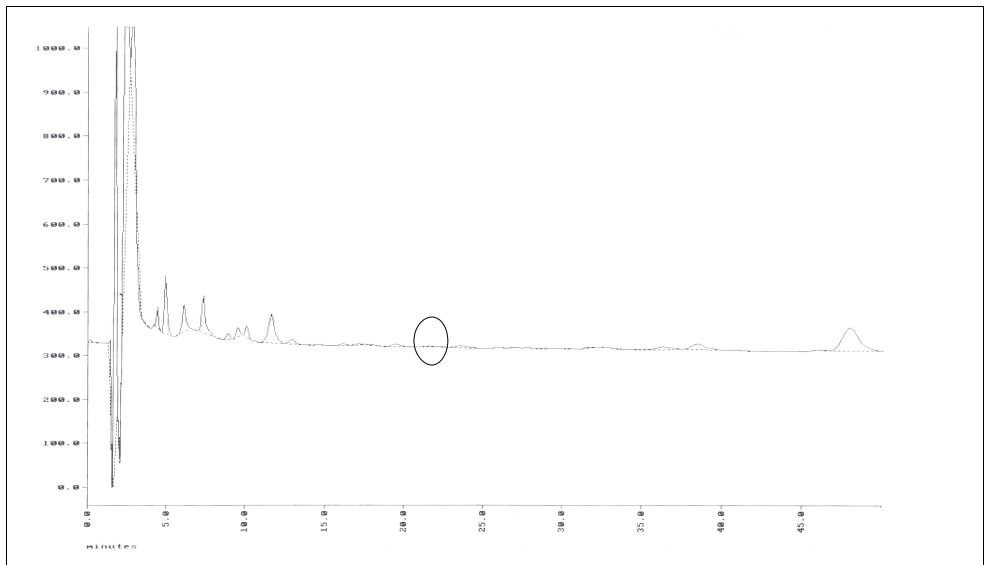


Fig 4.19 Eluizione putamen 2010_019

Non sono visibili residui di Cys-DA.

4.2.2.2.2 PUT 2009_007

L'estrazione è stata fatta da un soggetto di 72 anni.

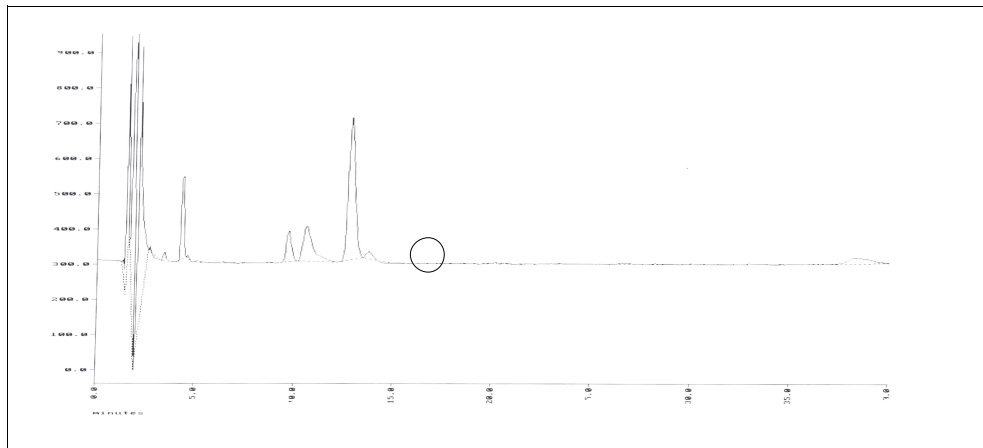


Fig. 4.20: NL putamen 2009_007

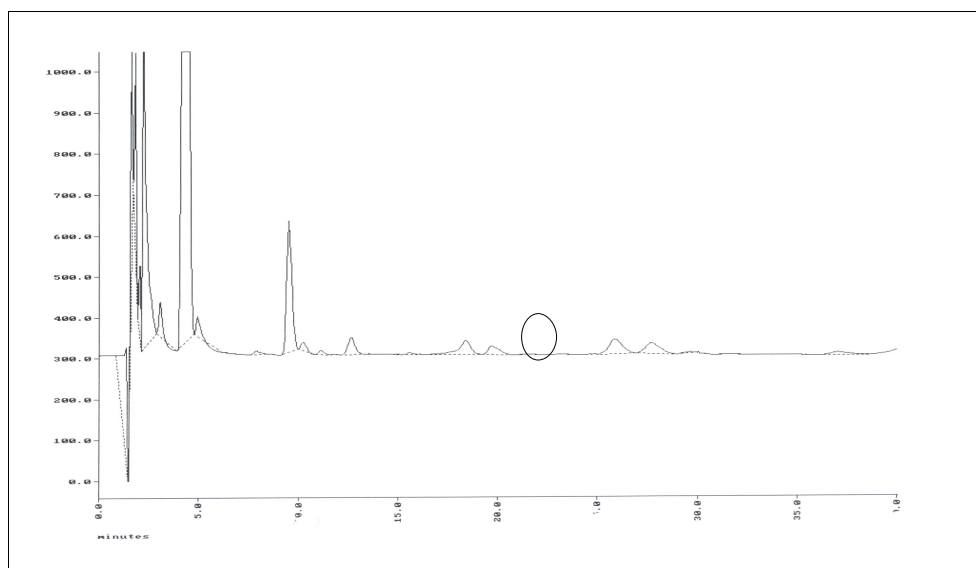


Fig. 4.21: Eluizione putamen 2010_019

In nessuna frazione sono presenti addotti Cys-DA.

4.2.2.2.3 PUT 2010_032

L'estrazione è stata fatta da un soggetto di 89 anni

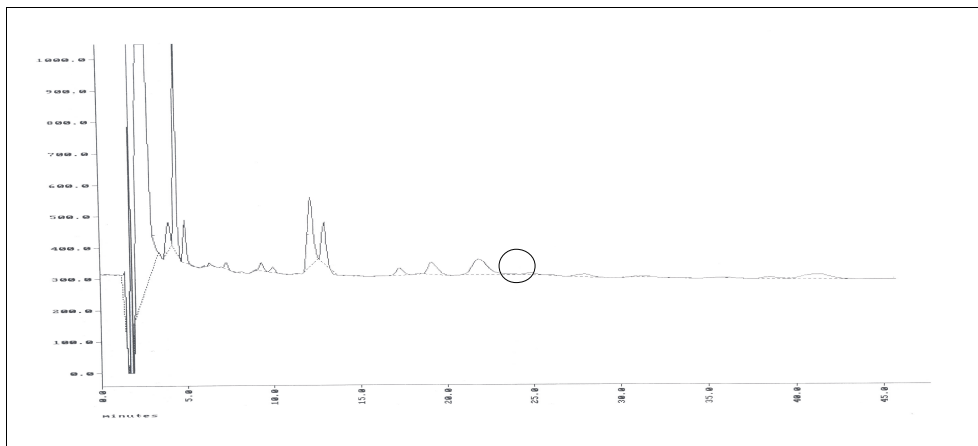


Fig 4.22: NL putamen 2010_032

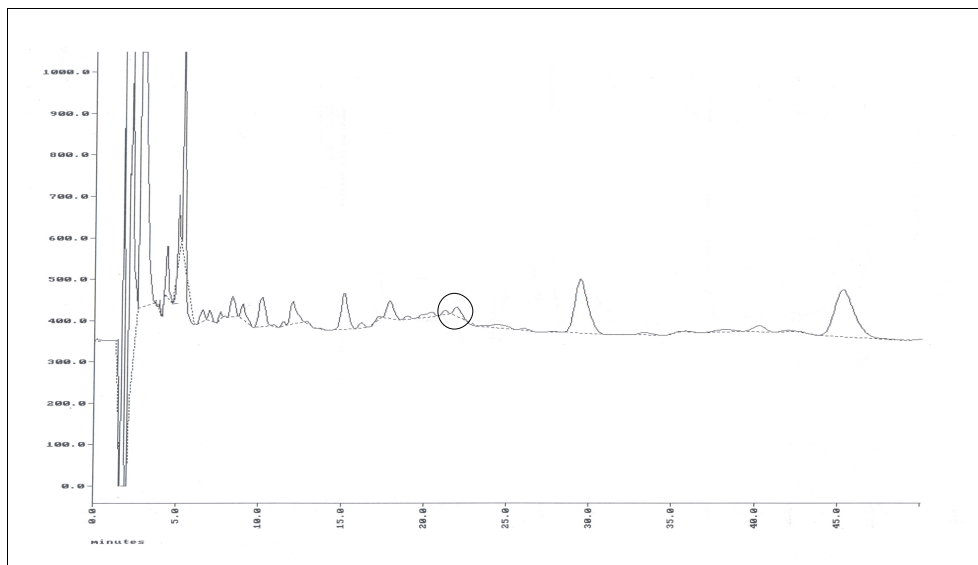


Fig. 4.23 Cromatogramma HPLC-EC della eluizione putamen 2010_032

Nel cromatogramma di questa eluizione è possibile vedere un picco al tempo di ritenzione della Cys-DA. Per approfondire la natura di questa molecola è stata fatta una analisi anche in HPLC-UV. In fig.4.24 viene riportato il cromatogramma ottenuto che non mostra un picco nel tempo di ritenzione tipico della Cys-DA a questa velocità di flusso, 12,5 minuti, per cui anche in questo caso viene esclusa la presenza dell'amminoacido modificato nell'idrolizzato.

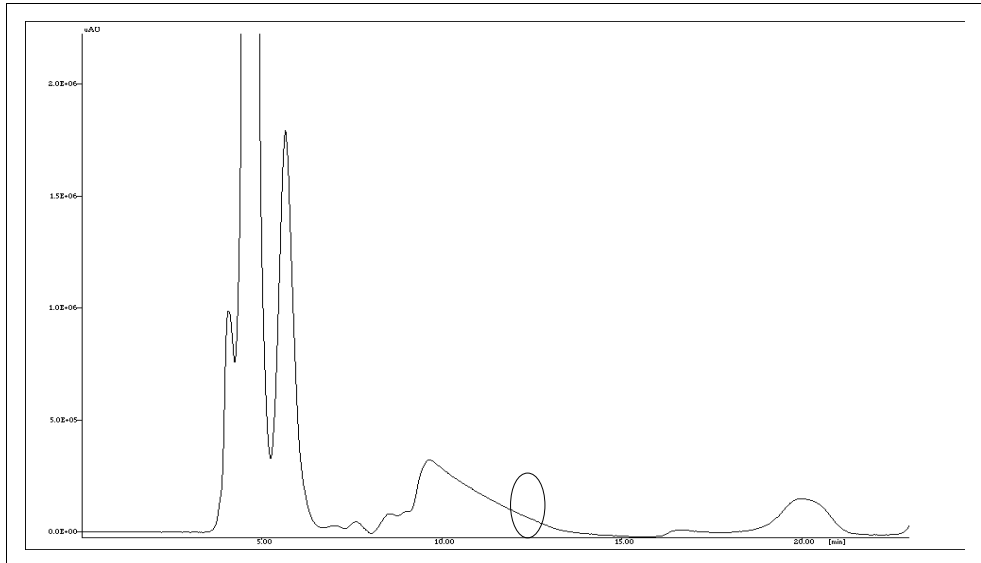


Fig 4.24: HPLC-UV della eluizione putamen 2010_032

4.2.2.2.3 PUT 2010_032 denaturato

In questo caso una parte dell'estrazione da putamen 2010_032 è stata denaturata aggiungendo SDS 2% e mantenendola a 100 °C per 5 minuti. La miscela proteica denaturata è stata caricata sulla resina e trattata come gli altri campioni. In figura 4.25 è mostrato il cromatogramma della eluizione:

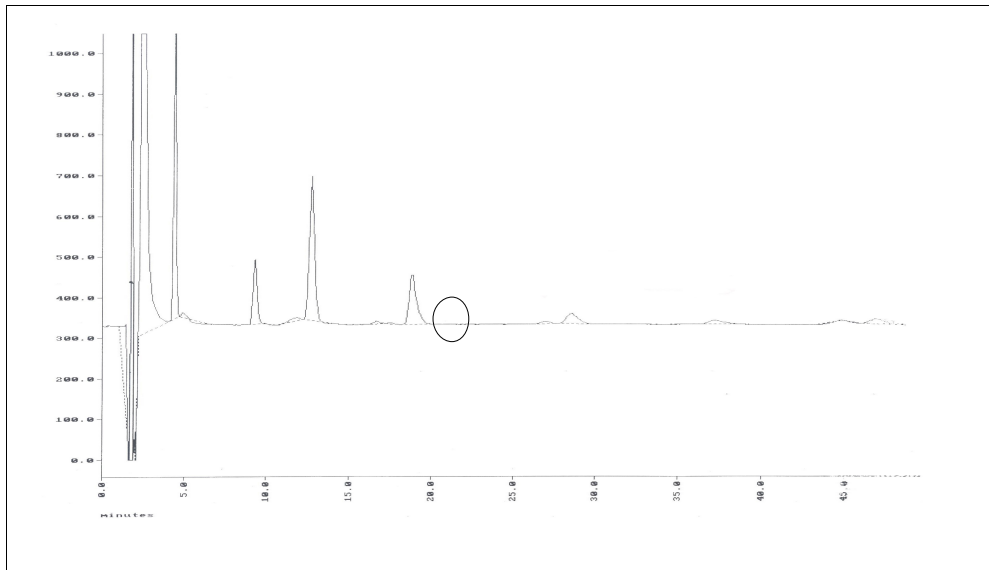


Fig. 4. 25: Cromatogramma della eluizione di putamen denaturato.

4.3 Analisi della cisteinil-DA libera nei tessuti cerebrali umani

L'analisi degli idrolizzati non ha permesso di rintracciare la presenza di Cys-DA proveniente da proteine in nessuna frazione analizzata. E' stata condotta una estrazione delle catecolammine libere sugli stessi soggetti da cui sono state estratte le proteine per verificare la presenza di Cys-DA libera nei tessuti. L'unico soggetto che non è stato analizzato è stato il SN 2009_022, sostituito da un soggetto di età comparabile. L'estrazione è stata effettuata omogenando il tessuto in una soluzione di HClO_4 contenente uno standard interno, isoproterenolo, da usarsi come riferimento. La quantità di Cys-DA libera è stata calcolata come rapporto tra l'area della Cys-DA e quella dell'isoproterenolo. I rapporti sono riportati nella tabella 4.1.

SN	Età	Rapporto con standard interno
2010_003	50	2,42
2009_026	71	2
2009_019	83	2,62
Put		
2010_019	60	0,59
2009_007	72	0,58
2010_032	89	0,31

Tabella 4.1: Tabella riassuntiva del rapporto tra Cys-DA libera e isoproterenolo nei tessuti di SN e putamen

Fornstedt e colleghi dimostrarono che la quantificazione della Cys-DA libera da tessuti post mortem non è da considerarsi strettamente quantitativa, perchè nelle prime 24 ore dalla morte il livello della Cys-DA può aumentare anche del 40%, perchè la DA viene liberata dalle vescicole e può reagire con le molecole circostanti [83]. E' stata analizzata comunque la presenza della Cys-DA libera per poter fare un confronto tra i due tessuti e per paragonare la presenza di Cys-DA libera con la eventuale Cys-DA derivata dalle proteine idrolizzate, considerando che le reazioni post mortem della DA possono avvenire anche verso le proteine citosoliche.

Anche tenendo conto dell'errore dovuto alla reattività della DA post mortem, la quantità di Cys-DA libera nella SN è nettamente superiore a quella nel putamen.

5. DISCUSSIONE

La dopamina, neurotrasmettitore della SN, area colpita da neurodegenerazione durante il morbo di Parkinson, è un potenziale fattore di rischio per le cellule [113]. Tende facilmente a ossidarsi e legarsi a composti nucleofili, come la cisteina [107]. Il legame della DA con residui di cisteina delle proteine potrebbe inattivare le funzioni della proteina stessa e essere pericoloso per la vita cellulare [108].

Lo scopo di questo lavoro è stato verificare se le proteine vengono modificate dalla DA nei tessuti cerebrali umani in condizioni fisiologiche. E' stata usata una resina di fenil boronato capace di legare i cis-dioli, tra cui le catecolammine, con l'intento di selezionare eventuali proteine dopaminate dal resto della componente proteica. E' stata scelta perchè il gruppo fenil-boronato della resina è in grado di legare i cis-dioli a pH basico, con un legame covalente reversibile a pH acido [95].

In primo luogo è stata verificata l'efficienza di tale sistema. Sono stati sintetizzati degli standard, Cys-DA e GSH-DA, e sono stati applicati sulla resina. La analisi in HPLC-EC e HPLC-UV ha mostrato che la quasi totalità delle molecole applicate si trova nella eluizione e quindi che la resina ha una buona efficienza di legame nei confronti delle catecolammine. Per verificare se il sistema utilizzato fosse adatto anche ad isolare le molecole dopaminate all'interno di una miscela complessa come un lisato cellulare è stata fatta una estrazione aggiungendo una quantità nota di DA e GSH-DA al buffer di lisi, e l'estratto è stato caricato sulla resina. Le molecole standard inserite sono per la quasi totalità nella eluizione. Questi dati mostrano che il metodo utilizzato per questo lavoro è molto efficiente, il legame specifico e che l'utilizzo della resina è un buon sistema per isolare composti dopaminati da una miscela.

Per studiare la presenza di eventuali composti dopaminati in tessuti cerebrali umani sono state condotte delle estrazioni proteiche da tessuti diversi, SN e putamen, da soggetti di tre fasce di età, tra 50 e 70 anni, tra 70 e 80 e tra 80 e 90.

Gli estratti sono stati applicati alla resina e il primo lavaggio e l'eluizione ottenuti sono stati idrolizzati, al fine di analizzare gli amminoacidi in HPLC-EC.

Sono stati confrontati tre soggetti diversi per la SN. In nessuno di questi è stata rilevata la presenza di Cys-DA proveniente da proteine idrolizzate.

Sono stati confrontati tre soggetti diversi anche per il putamen ma nemmeno in questi sono stati trovati amminoacidi dopaminati. Per escludere che i residui amminoacidici dopaminati si trovino in punti della proteina non accessibili alla resina per motivi di ingombro sterico un estratto proteico è stato denaturato prima di essere applicato sulla resina, ma nemmeno in questo caso sono state trovate tracce di Cys-DA.

E' stata effettuata inoltre una estrazione della Cys-DA libera dagli stessi tessuti da cui sono state estratte le proteine. La soluzione usata per estrarre le catecolammine viene iniettata in HPLC-EC per verificare la presenza della Cys-DA. Nonostante questo tipo di analisi non sia da considerarsi quantitativa a causa della tendenza della DA a reagire anche in tessuti post-mortem [83], lo scopo di questo esperimento era confermare che nei tessuti che sono stati analizzati è avvenuto il legame tra DA e cisteina libera. E' risultato che nella SN è presente una grande quantità di Cys-DA libera, nel putamen una quantità inferiore.

Utilizzando quindi il sistema che si avvale dell'uso della resina PBA non sono state trovate proteine dopaminate né nella SN né nel putamen di soggetti non affetti da Parkinson e non è stata rilevata differenza tra soggetti di età diverse. Questo potrebbe derivare sia da una mancata formazione degli addotti proteina-dopamina sia dall'impossibilità di rilevarli.

Il primo caso potrebbe essere dovuto al fatto che nella SN sono presenti alte concentrazioni di cisteina libera. Questa potrebbe rappresentare un sistema di protezione nei confronti delle proteine, dato che la cisteina libera è più disponibile per il legame rispetto ai residui inseriti in una catena peptidica. La NM inoltre si forma a partire da DA libera nelle cellule e quindi potrebbe essere un mezzo a

disposizione della cellula per depositare la DA in eccesso. Mentre *in vitro* la DA in eccesso si lega alle proteine, è possibile che *in vivo*, nel corso di un processo più lento, possa polimerizzare formando il pigmento.

Nel secondo caso una possibile spiegazione è che avvenga il legame tra DA e proteine, ma che le proteine danneggiate vengano inglobate nella NM, che come è stato visto precedentemente, ha una grande affinità per molte molecole potenzialmente tossiche per la cellula. Un'altra spiegazione possibile è che nei soggetti non affetti da PD i sistemi ubiquitina-proteasoma siano in grado di rimuovere le proteine danneggiate con grande efficienza. Nel putamen i livelli di glutatione sono più alti rispetto alla SN, per cui è possibile che riesca a bloccare la polimerizzazione della DA, dato che anche i livelli di Cys-DA sono molto più bassi di quelli della SN.

Come ultima possibilità è importante ricordare che la DA legata a un residuo di cisteina può ancora reagire con altre molecole. Poiché l'analisi effettuata in HPLC-EC è estremamente precisa, usando come standard la Cys-DA è possibile che dei residui di cisteina a cui si sono legate più molecole di DA non siano state rilevate o riconosciute.

Per completare il lavoro presentato in futuro occorrerebbe confrontare i soggetti presi in esame con soggetti parkinsoniani della stessa età, per verificare se in individui aventi un sistema ubiquitina-proteasoma già compromesso c'è una differenza nella presenza di proteine dopaminate. Sarebbe inoltre interessante analizzare le frazioni eluite con LC-LC/MS per cercare un maggior numero di modificazioni e per poter identificare eventuali frammenti peptidici.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Parkinson, "An essay on the shaking palsy. 1817," *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, vol. 14, n°. 2, pagg. 223-236; discussion 222, 2002.
- [2] W. Dauer e S. Przedborski, "Parkinson's disease: mechanisms and models," *Neuron*, vol. 39, n°. 6, pagg. 889-909, 2003.
- [3] A. J. Lees, J. Hardy, e T. Revesz, "Parkinson's disease," *Lancet*, vol. 373, n°. 9680, pagg. 2055-66, 2009.
- [4] D. W. Lee e J. K. Andersen, "Iron elevations in the aging Parkinsonian brain: a consequence of impaired iron homeostasis?," *J Neurochem*, vol. 112, n°. 2, pagg. 332-9, 2010.
- [5] G. Levy, "The relationship of Parkinson disease with aging," *Arch Neurol*, vol. 64, n°. 9, pagg. 1242-6, 2007.
- [6] D. Sulzer et al., "Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, n°. 22, pagg. 11869-74, 2000.
- [7] M. Zareba, A. Bober, W. Korytowski, L. Zecca, e T. Sarna, "The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems," *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, vol. 1271, n°. 2, pagg. 343-348, 1995.
- [8] T. Hatano, S. Kubo, S. Sato, e N. Hattori, "Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 111, n°. 5, pagg. 1075-1093, Dic. 2009.

- [9] E. H. Norris et al., "Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n°. 22, pagg. 21212-21219, Giu. 2005.
- [10] R. Jakes, M. G. Spillantini, e M. Goedert, "Identification of two distinct synucleins from human brain," *FEBS Letters*, vol. 345, n°. 1, pagg. 27-32, Mag. 1994.
- [11] D. E. Cabin et al., "Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, n°. 20, pagg. 8797-8807, Ott. 2002.
- [12] A. Abeliovich et al., "Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system," *Neuron*, vol. 25, n°. 1, pagg. 239-252, Gen. 2000.
- [13] K. Ueda et al., "Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, n°. 23, pagg. 11282-11286, Dic. 1993.
- [14] D. Campion et al., "The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease," *Genomics*, vol. 26, n°. 2, pagg. 254-257, Mar. 1995.
- [15] M. H. Polymeropoulos et al., "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 276, n°. 5321, pagg. 2045-2047, Giu. 1997.
- [16] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, e M. Goedert, "Alpha-synuclein in Lewy bodies," *Nature*, vol. 388, n°. 6645, pagg. 839-840, Ago. 1997.

- [17] M. G. Spillantini e M. Goedert, "The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 920, pagg. 16-27, 2000.
- [18] M. Farrer et al., "alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease," *Human Molecular Genetics*, vol. 10, n°. 17, pagg. 1847-1851, Ago. 2001.
- [19] A. B. Singleton et al., "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 302, n°. 5646, pag. 841, Ott. 2003.
- [20] M. Chartier-Harlin et al., "Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease," *Lancet*, vol. 364, n°. 9440, pagg. 1167-1169, Ott. 2004.
- [21] K. A. Conway, J. D. Harper, e P. T. Lansbury, "Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease," *Nature Medicine*, vol. 4, n°. 11, pagg. 1318-1320, Nov. 1998.
- [22] K. A. Conway, J. C. Rochet, R. M. Bieganski, e P. T. Lansbury, "Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, n°. 5545, pagg. 1346-1349, Nov. 2001.
- [23] R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov, e J. T. Greenamyre, "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease," *Nature Neuroscience*, vol. 3, n°. 12, pagg. 1301-1306, Dic. 2000.
- [24] W. Li, C. Lesuisse, Y. Xu, J. C. Troncoso, D. L. Price, e M. K. Lee, "Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, n°. 33, pagg. 7400-7409, Ago. 2004.

- [25] L. Petrucelli et al., "Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons," *Neuron*, vol. 36, n°. 6, pagg. 1007-1019, Dic. 2002.
- [26] A. M. Cuervo, L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury, e D. Sulzer, "Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 305, n°. 5688, pagg. 1292-1295, Ago. 2004.
- [27] L. J. Hsu et al., "alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress," *The American Journal of Pathology*, vol. 157, n°. 2, pagg. 401-410, Ago. 2000.
- [28] N. Gosavi, H. Lee, J. S. Lee, S. Patel, e S. Lee, "Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n°. 50, pagg. 48984-48992, Dic. 2002.
- [29] J. Lotharius, S. Barg, P. Wiekop, C. Lundberg, H. K. Raymon, e P. Brundin, "Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n°. 41, pagg. 38884-38894, Ott. 2002.
- [30] H. Matsumine et al., "Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27," *American Journal of Human Genetics*, vol. 60, n°. 3, pagg. 588-596, Mar. 1997.
- [31] H. Shimura et al., "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase," *Nature Genetics*, vol. 25, n°. 3, pagg. 302-305, Lug. 2000.

- [32] M. S. Goldberg et al., "Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 44, pagg. 43628-43635, Ott. 2003.
- [33] J. J. Palacino et al., "Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n° 18, pagg. 18614-18622, Apr. 2004.
- [34] F. Darios et al., "Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, n° 5, pagg. 517-526, Mar. 2003.
- [35] H. Jiang, Y. Ren, J. Zhao, e J. Feng, "Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis," *Human Molecular Genetics*, vol. 13, n° 16, pagg. 1745-1754, Ago. 2004.
- [36] T. Taira, Y. Saito, T. Niki, S. M. M. Iguchi-Arigo, K. Takahashi, e H. Ariga, "DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death," *EMBO Reports*, vol. 5, n° 2, pagg. 213-218, Feb. 2004.
- [37] D. J. Moore et al., "Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress," *Human Molecular Genetics*, vol. 14, n° 1, pagg. 71-84, Gen. 2005.
- [38] R. R. Kopito, "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation," *Trends in Cell Biology*, vol. 10, n° 12, pagg. 524-530, Dic. 2000.
- [39] K. B. Beckman e B. N. Ames, "The free radical theory of aging matures," *Physiological Reviews*, vol. 78, n° 2, pagg. 547-581, Apr. 1998.
- [40] V. Jackson-Lewis et al., "Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 424, n° 3, pagg. 476-488, Ago. 2000.

- [41] J. W. Langston, P. Ballard, J. W. Tetrud, e I. Irwin, "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis," *Science*, vol. 219, n°. 4587, pagg. 979-80, 1983.
- [42] S. P. Markey, J. N. Johannessen, C. C. Chiueh, R. S. Burns, e M. A. Herkenham, "Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism," *Nature*, vol. 311, n°. 5985, pagg. 464-467, Ott. 1984.
- [43] J. A. Javitch, R. J. D'Amato, S. M. Strittmatter, e S. H. Snyder, "Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, n°. 7, pagg. 2173-2177, Apr. 1985.
- [44] L. K. Klaidman, J. D. Adams, A. C. Leung, S. S. Kim, e E. Cadenas, "Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 15, n°. 2, pagg. 169-179, Ago. 1993.
- [45] Y. Liu, A. Roghani, e R. H. Edwards, "Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, n°. 19, pagg. 9074-9078, Ott. 1992.
- [46] T. B. Sherer, R. Betarbet, e J. T. Greenamyre, "Environment, mitochondria, and Parkinson's disease," *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, vol. 8, n°. 3, pagg. 192-197, Giu. 2002.
- [47] E. Hasegawa, K. Takeshige, T. Oishi, Y. Murai, e S. Minakami, "1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation

- and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 170, n°. 3, pagg. 1049-1055, Ago. 1990.
- [48] W. J. Nicklas, I. Vyas, e R. E. Heikkila, “Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine,” *Life Sciences*, vol. 36, n°. 26, pagg. 2503-2508, Lug. 1985.
- [49] R. G. Johnson, “Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport,” *Physiological Reviews*, vol. 68, n°. 1, pagg. 232-307, Gen. 1988.
- [50] L. Zecca, D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. G. Fariello, e D. Sulzer, “Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour,” *Molecular Pathology: MP*, vol. 54, n°. 6, pagg. 414-418, Dic. 2001.
- [51] N. A. Tatton e S. J. Kish, “In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining,” *Neuroscience*, vol. 77, n°. 4, pagg. 1037-1048, Apr. 1997.
- [52] A. L. McCormack et al., “Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat,” *Neurobiology of Disease*, vol. 10, n°. 2, pagg. 119-127, Lug. 2002.
- [53] T. B. Sherer, J. H. Kim, R. Betarbet, e J. T. Greenamyre, “Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation,” *Experimental Neurology*, vol. 179, n°. 1, pagg. 9-16, Gen. 2003.

- [54] D. J. Talpade, J. G. Greene, D. S. Higgins, e J. T. Greenamyre, "In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone," *Journal of Neurochemistry*, vol. 75, n°. 6, pagg. 2611-2621, Dic. 2000.
- [55] G. P. Davey, S. Peuchen, e J. B. Clark, "Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n°. 21, pagg. 12753-12757, Mag. 1998.
- [56] R. H. Swerdlow et al., "Matrilineal inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family," *Annals of Neurology*, vol. 44, n°. 6, pagg. 873-881, Dic. 1998.
- [57] W. Dauer et al., "Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, n°. 22, pagg. 14524-14529, Ott. 2002.
- [58] D. D. Song, C. W. Shults, A. Sisk, E. Rockenstein, e E. Masliah, "Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP," *Experimental Neurology*, vol. 186, n°. 2, pagg. 158-172, Apr. 2004.
- [59] J. Sian et al., "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia," *Annals of Neurology*, vol. 36, n°. 3, pagg. 348-355, Set. 1994.
- [60] L. Zecca, M. B. H. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor, e R. R. Crichton, "Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders," *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 5, n°. 11, pagg. 863-873, Nov. 2004.
- [61] R. G. Fariello et al., "The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging,"

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, n°. 26, pagg. 9843-9848, Giu. 2004.
- [62] L. Zecca, F. A. Zucca, A. Albertini, E. Rizzio, e R. G. Fariello, "A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease," *Neurology*, vol. 67, n°. 7, pagg. S8-S11, 2006.
- [63] L. Zecca et al., "New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, n°. 45, pagg. 17567-17572, Nov. 2008.
- [64] G. Odh, R. Carstam, J. Paulson, A. Wittbjør, E. Rosengren, e H. Rorsman, "Neuromelanin of the human substantia nigra: a mixed-type melanin," *Journal of Neurochemistry*, vol. 62, n°. 5, pagg. 2030-2036, Mag. 1994.
- [65] L. Zecca et al., "Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease," *J Neurochem*, vol. 106, n°. 4, pagg. 1866-75, 2008.
- [66] L. Zecca, P. Costi, C. Mecacci, S. Ito, M. Terreni, e S. Sonnino, "Interaction of human substantia nigra neuromelanin with lipids and peptides," *J Neurochem*, vol. 74, n°. 4, pagg. 1758-65, 2000.
- [67] D. Sulzer et al., "Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, n°. 22, pagg. 11869-11874, Ott. 2000.
- [68] K. Wakamatsu, K. Fujikawa, F. A. Zucca, L. Zecca, e S. Ito, "The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods," *Journal of Neurochemistry*, vol. 86, n°. 4, pagg. 1015-1023, 2003.

- [69] L. Zecca et al., "New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, n°. 45, pagg. 17567-17572, 2008.
- [70] D. T. Dexter et al., "Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 52, n°. 6, pagg. 1830-1836, Giu. 1989.
- [71] J. R. Connor, B. S. Snyder, P. Arosio, D. A. Loeffler, e P. LeWitt, "A quantitative analysis of isoferitins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains," *Journal of Neurochemistry*, vol. 65, n°. 2, pagg. 717-724, Ago. 1995.
- [72] L. Zecca, D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. G. Fariello, e D. Sulzer, "Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour," *Mol Pathol*, vol. 54, n°. 6, pagg. 414-8, 2001.
- [73] W. Zhang et al., "Neuromelanin Activates Microglia and Induces Degeneration of Dopaminergic Neurons: Implications for Progression of Parkinson's Disease," *Neurotoxicity Research*, Dic. 2009.
- [74] J. F. Cubells, S. Rayport, G. Rajendran, e D. Sulzer, "Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 14, n°. 4, pagg. 2260-2271, Apr. 1994.
- [75] D. Sulzer e L. Zecca, "Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review," *Neurotox Res*, vol. 1, n°. 3, pagg. 181-95, 2000.
- [76] F. Fumagalli, R. R. Gainetdinov, Y. M. Wang, K. J. Valenzano, G. W. Miller, e M. G. Caron, "Increased methamphetamine neurotoxicity in heterozygous vesicular monoamine transporter 2 knock-out mice," *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 19, n°. 7, pagg. 2424-2431, Apr. 1999.
- [77] D. G. Graham, "Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones," *Molecular Pharmacology*, vol. 14, n°. 4, pagg. 633-643, Lug. 1978.
- [78] A. J. Nappi, E. Vass, G. Prota, e S. Memoli, "The effects of hydroxyl radical attack on dopa, dopamine, 6-hydroxydopa, and 6-hydroxydopamine," *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, vol. 8, n°. 6, pagg. 283-293, Dic. 1995.
- [79] B. Halliwell, "Reactive oxygen species and the central nervous system," *Journal of Neurochemistry*, vol. 59, n°. 5, pagg. 1609-1623, Nov. 1992.
- [80] S. Nicolis, M. Zucchelli, E. Monzani, e L. Casella, "Myoglobin modification by enzyme-generated dopamine reactive species," *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, vol. 14, n°. 28, pagg. 8661-8673, 2008.
- [81] Y. Xu, A. H. Stokes, W. M. Freeman, S. C. Kumer, B. A. Vogt, e K. E. Vrana, "Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra," *Brain Research. Molecular Brain Research*, vol. 45, n°. 1, pagg. 159-162, Apr. 1997.
- [82] T. G. Hastings, "Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase," *Journal of Neurochemistry*, vol. 64, n°. 2, pagg. 919-924, Feb. 1995.
- [83] B. Fornstedt, A. Brun, E. Rosengren, e A. Carlsson, "The apparent autoxidation rate of catechols in dopamine-rich regions of human brains increases with the degree of depigmentation of substantia nigra," *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section*, vol. 1, n°. 4, pagg. 279-295, 1989.

- [84] B. Fornstedt, E. Rosengren, e A. Carlsson, "Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species," *Neuropharmacology*, vol. 25, n°. 4, pagg. 451-454, Apr. 1986.
- [85] S. Ito e K. Fujita, "Conjugation of dopa and 5-S-cysteinyl dopa with cysteine mediated by superoxide radical," *Biochemical Pharmacology*, vol. 31, n°. 18, pagg. 2887-2889, Set. 1982.
- [86] H. Li e G. Dryhurst, "Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, n°. 4, pagg. 1530-1541, Ott. 1997.
- [87] J. P. Spencer, P. Jenner, S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden, e B. Halliwell, "Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species," *J Neurochem*, vol. 71, n°. 5, pagg. 2112-22, 1998.
- [88] M. J. LaVoie e T. G. Hastings, "Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 19, n°. 4, pagg. 1484-1491, Feb. 1999.
- [89] D. M. Kuhn, R. E. Arthur, D. M. Thomas, e L. A. Elferink, "Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 73, n°. 3, pagg. 1309-1317, Set. 1999.
- [90] T. G. Hastings, D. A. Lewis, e M. J. Zigmond, "Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections," *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, n°. 5, pagg. 1956-1961, Mar. 1996.

- [91] M. Asanuma, I. Miyazaki, F. J. Diaz-Corrales, e N. Ogawa, "Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism," *Acta Med Okayama*, vol. 58, n°. 5, pagg. 221-33, 2004.
- [92] J. Rochet et al., "Interactions among alpha-synuclein, dopamine, and biomembranes: some clues for understanding neurodegeneration in Parkinson's disease," *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, vol. 23, n°. 1, pagg. 23-34, 2004.
- [93] J. Xu, S. Kao, F. J. S. Lee, W. Song, L. Jin, e B. A. Yankner, "Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease," *Nature Medicine*, vol. 8, n°. 6, pagg. 600-606, Giu. 2002.
- [94] E. S. P. Wong et al., "Relative sensitivity of parkin and other cysteine-containing enzymes to stress-induced solubility alterations," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, n°. 16, pagg. 12310-12318, Apr. 2007.
- [95] M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, A. Weihofen, M. G. Schlossmacher, e D. J. Selkoe, "Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin," *Nature Medicine*, vol. 11, n°. 11, pagg. 1214-1221, Nov. 2005.
- [96] D. M. Kuhn e R. Arthur, "Dopamine inactivates tryptophan hydroxylase and forms a redox-cycling quinoprotein: possible endogenous toxin to serotonin neurons," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 18, n°. 18, pagg. 7111-7117, Set. 1998.
- [97] R. L. Nussbaum e M. H. Polymeropoulos, "Genetics of Parkinson's disease," *Hum Mol Genet*, vol. 6, n°. 10, pagg. 1687-91, 1997.

- [98] D. M. Kuhn e R. E. Arthur, "L-DOPA-quinone inactivates tryptophan hydroxylase and converts the enzyme to a redox-cycling quinoprotein," *Brain Research. Molecular Brain Research*, vol. 73, n°. 1, pagg. 78-84, Nov. 1999.
- [99] Y. Xu, A. H. Stokes, R. Roskoski, e K. E. Vrana, "Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 54, n°. 5, pagg. 691-697, Dic. 1998.
- [100] X. M. Shen, H. Li, e G. Dryhurst, "Oxidative metabolites of 5-S-cysteinyl-dopamine inhibit the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: possible relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease," *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, vol. 107, n°. 8, pagg. 959-978, 2000.
- [101] H. Li e G. Dryhurst, "Oxidative metabolites of 5-S-cysteinyl-dopamine inhibit the pyruvate dehydrogenase complex," *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, vol. 108, n°. 12, pagg. 1363-1374, 2001.
- [102] R. E. Whitehead, J. V. Ferrer, J. A. Javitch, e J. B. Justice, "Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter," *Journal of Neurochemistry*, vol. 76, n°. 4, pagg. 1242-1251, Feb. 2001.
- [103] J. H. Kang, "Modification of Cu,Zn-superoxide dismutase by oxidized catecholamines," *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 37, n°. 3, pagg. 325-329, Mag. 2004.
- [104] F. H. Khan, T. Sen, A. K. Maiti, S. Jana, U. Chatterjee, e S. Chakrabarti, "Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: implications for Parkinson's disease," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1741, n°. 1, pagg. 65-74, Giu. 2005.

- [105] S. B. Berman e T. G. Hastings, "Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease," *J Neurochem*, vol. 73, n°. 3, pagg. 1127-37, 1999.
- [106] V. S. Van Laar, A. A. Dukes, M. Cascio, e T. G. Hastings, "Proteomic analysis of rat brain mitochondria following exposure to dopamine quinone: implications for Parkinson disease," *Neurobiol Dis*, vol. 29, n°. 3, pagg. 477-89, 2008.
- [107] T. G. Hastings, D. A. Lewis, e M. J. Zigmond, "Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 387, pagg. 97-106, 1996.
- [108] D. Sulzer e L. Zecca, "Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review," *Neurotox Res*, vol. 1, n°. 3, pagg. 181-95, 2000.
- [109] H. Wang et al., "Development and evaluation of a micro- and nanoscale proteomic sample preparation method," *Journal of Proteome Research*, vol. 4, n°. 6, pagg. 2397-2403, Dic. 2005.
- [110] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, e R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, n°. 1, pagg. 265-275, Nov. 1951.
- [111] M. Bisaglia, S. Mammi, e L. Bubacco, "Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alpha-synuclein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, n°. 21, pagg. 15597-15605, Mag. 2007.
- [112] C. W. Gehrke, K. C. Kuo, G. E. Davis, R. D. Suits, T. P. Waalkes, e E. Borek, "Quantitative high-performance liquid chromatography of

nucleosides in biological materials," *Journal of Chromatography*, vol. 150, n°. 2, pagg. 455-476, Mar. 1978.

- [113] I. Miyazaki e M. Asanuma, "Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself," *Acta Med Okayama*, vol. 62, n°. 3, pagg. 141-50, 2008.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti i ragazzi del laboratorio Zecca: Fabio, per i preziosissimi consigli e per le indicazioni, Mireille per il grande aiuto, Chiara, Francesca per il sostegno e la compagnia, Renzo per la disponibilità gratuita e costante.

Ringrazio il dott. Luigi Zecca per avermi permesso di svolgere l'attività del dottorato nel suo laboratorio di Neurochimica (Istituto di Tecnologie Biomediche-ITB CNR).

Desidero ringraziare l'Istituto di Medicina Legale (Università degli Studi di Milano) per la collaborazione nel reperimento dei tessuti.

La mia più sentita riconoscenza va anche al Prof. Casella, al dott. Enrico Monzani, alla dott.ssa Stefania Nicolis per avermi ospitato nel loro laboratorio e per le importanti indicazioni che mi hanno dato.

Ringrazio gli amici che mi hanno sostenuto e accompagnato in questi anni: Raffa, Marco, Benedetta e Francesca.

Infine ringrazio le persone senza le quali questa tesi veramente non ci sarebbe stata: i miei genitori per l'affetto e la fiducia che mi hanno sempre dimostrato.